

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MÁRIO SÉRGIO PIANTAVINI

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO
ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO KÓJICO POR
COMPLEXAÇÃO COM ALUMÍNIO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO**

**CURITIBA
2010**

MÁRIO SÉRGIO PIANTAVINI

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO
ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO KÓJICO POR
COMPLEXAÇÃO COM ALUMÍNIO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

Co-orientadora: Prof. Dra. Ângela Cristina Leal
Badaró Trindade

**CURITIBA
2010**

Termo de aprovação

Dedico este trabalho

À Deus e Aos meus pais Sérgio e Maria Aparecida

Às minhas avós (*in memoriam*) e todos os familiares
pela educação, formação e amor que sempre me
deram em todas as fases da vida

E amigos que de muitas formas me incentivaram e
ajudaram para que fosse possível a concretização
deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Diversas espécies de aves migram ou se deslocam regularmente de uma região para outra, de acordo com a mudança das estações. Na antiguidade os gregos conheciam esse procedimento das aves em busca de clima favorável para sua sobrevivência, tanto que as tinham como símbolo da amizade e da fidelidade porque elas voltavam anualmente para ocupar o mesmo ninho. Inspirado por elas o filósofo grego Aristóteles (384-322 a.C.) cunhou a frase “uma andorinha só não faz primavera”, ou “não faz verão”. Dentre as possíveis interpretações pode-se entender que as ações praticadas por um único indivíduo podem não ser suficientes para solucionar todos os problemas ou o problema de todos. Entretanto na coletividade encontramos pontos como a pluralidade de pensamentos, a complementaridade, a reciprocidade e outros valores que nos tornam muito mais fortes e resistentes. Na própria natureza encontramos exemplos disso como na revoada dos gansos ou na resistência ao frio dos pingüins. A todos que participaram ativamente dessa jornada deixo meus agradecimentos, mas alguns em especial que de fato fizeram valer o ideal da amizade e coletividade.

Em primeiro lugar a Deus por tudo que nos proporciona diariamente. Aos meus pais e minha família o meu muito obrigado pelas lições que ainda me dão, pelo carinho e amor que necessito para continuar em frente. À minha namorada Elaine, que é meu porto seguro para enfrentar todas as tormentas, por ser minha essência, pela compreensão e amor que é um privilégio que usufruo com imensa alegria.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e ao Departamento de Farmácia da UFPR que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho, em especial ao Centro de Estudos em Biofarmácia e seus colaboradores em nome da Dra. Francinete R.C. pela parceria. Ao departamento de Química da UFPR pela disponibilidade de uso do infravermelho e ao mesmo tempo à colaboração da doutoranda Gilcélia A. Cordeiro pelo auxílio imprescindível. Ao departamento de

Bioquímica pelo uso do RMN. À farmacêutica Dagmar da farmácia de manipulação DAGFARMA pela colaboração, amizade e oportunidade.

Ao professor Dr. Roberto Pontarolo falta-me léxico para expressar em singelas linhas o “desafio” que foi chegar até aqui desde o primeiro dia há anos em busca de um mero estágio em laboratório até o dia de colher os louros e ser reconhecido como Mestre. Simples demais seriam as palavras neste momento, mas fica aqui o sentimento de um privilegiado por ter sido realmente orientado por quem, de fato, é uma pessoa que por conhecimento adquirido e experiência de vida pode ser considerado um espelho ou um norte a ser seguido, um legítimo professor. Muito obrigado por tudo.

Ao professor Dr. Alan G. Gonçalves pela valiosa contribuição, dedicando seu tempo a longas discussões e diversos trabalhos práticos para me ajudar a ficar “na crista da onda”. À professora Dra. Ângela C. L. B. Trindade pelo companheirismo e por importantes auxílios em momentos decisivos nesse “trem” de trabalho. Ao professor Dr. Cassyano J. Correr pela sempre disposta ajuda nos “quatro cantos” do laboratório. À professora Márcia Olandoski que foi estatisticamente significativa com os resultados deste trabalho. À professora Dra. Ana L. R. Mercê pela disposição, paciência e complexos ensinamentos por todo esse tempo de parceria. Ao professor Dr. Paulo Roberto Janissek pela disposição e colaboração de grande importância e relevância. A todos os amigos mais antigos, os do mestrado e em especial aos do laboratório (Rafael V., Jocy D. C., Andreia e Consuelo pela amizade, Luana L. pela parceria em infinitos projetos, Astrid W. pelas palavras e sinceras atitudes de ajuda em todos os momentos dentro e fora do laboratório— Vielen Dank/ Grazie Mille).

A todos digo que não consigo expressar tudo o que desejo, pois há sentimentos que a linguagem não expressa e emoções que as palavras não sabem traduzir.

"BOM MESMO É IR À LUTA COM DETERMINAÇÃO,
ABRAÇAR A VIDA E VIVER COM PAIXÃO,
PERDER COM CLASSE E VIVER COM OUSADIA,
POIS O TRIUNFO PERTENCE A QUEM SE ATREVE,
E A VIDA É MUITO BELA PARA SER INSIGNIFICANTE."

(Charles Chaplin)

RESUMO

O ácido kójico (AK, 5-hidroxi-2-hidroximetil-4-pirona) é um ácido orgânico, comumente produzido por cepas de *Aspergillus sp.* Isolado pela primeira vez por Saito (1907), nome e a estrutura foram definidos por Jabuta em 1924. Tem diversas aplicações, dentre as quais as mais importantes são: na indústria alimentícia como antioxidante; na saúde pública em tratamento de doenças como a β -talassemia e o diabetes; na indústria cosmética como clareador, pois inibe a síntese da melanina.

No presente trabalho foi desenvolvido e validado um método espectrofotométrico na região do UV. Tomou-se por base a capacidade do analito de formar complexo com cátions metálicos, neste caso escolhido o Al^{3+} , por não apresentar propriedade paramagnética, já que esta poderia interferir na análise do complexo por RMN.

O solvente que se mostrou mais apropriado foi o metanol, pois permitiu um deslocamento batocrômico maior além de solubilizar facilmente o analito e seu complexo, também produziu solução límpida do produto formulado creme cosmético, facilitando assim a análise.

O complexo formado AK-Al^{3+} foi analisado por espectroscopia eletrônica, IV, titulação potenciométrica e RMN ^{13}C . Pelos espectros de UV verificou-se um deslocamento batocrômico quando se adiciona alumínio em meio ácido à solução de AK. Pela titulação potenciométrica constatou-se que, apesar de se ter duas aparentes inflexões, o cálculo da segunda derivada confirmou que o AK sofre apenas uma ionização com um valor de $\text{pK}_a = 7,68 \pm 0,02$. Pela adição de Al^{3+} há formação de complexos, dependentes do pH e da proporção molar AK:Al^{3+} .

A comparação de espectros no IV do AK, não complexado e complexado, em diferentes valores de pH, permitiu correlacionar as modificações na absorção dos picos referentes aos grupamentos enólico (3200 e 1350 cm^{-1}) e carbonílico (1768 e 1700 cm^{-1}). Os dados dos deslocamentos químicos dos carbonos permitiram concluir que, na variação para pH alcalino, a blindagem do C-2 e desblindagem de C-4 e C-5 ocorrem pelo rearranjo da molécula.

Comparando os deslocamentos entre os carbonos do AK não complexado e complexado em meio ácido (pH 4) verificou-se que apenas C-3 se blindava, enquanto que C-2, C-4 e C-5 se desblindam. A partir desses resultados foi possível sugerir que a estruturas do AK dependem do pH e da proporção molar AK/Al^{3+} no meio, e confirmam a saída do hidrogênio da hidroxila enólica e da complexação do alumínio entre a carbonila e o grupo enol do AK.

O método espectrofotométrico desenvolvido com base na complexação do AK:Al^{3+} , mostrou um desempenho muito bom na validação. Foi linear no intervalo de entre 5 - $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ de AK ($r = 0,9998$), seletivo, sensível ($\text{LD} = 0,15\text{ }\mu\text{g/mL}$ e $\text{LQ} = 0,46\text{ }\mu\text{g/mL}$), preciso (DPR de $0,402\%$, $1,284$ e $1,192$ para 10 , 15 e $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ na repetitividade; DPR de $2,171$, $0,976$ e $0,440$ para 10 , 15 e $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ na precisão intermediária), exato ($\pm 100\%$) e robusto (para pequenas variações no pH, temperatura e tempo de leitura). O método espectrofotométrico na região do UV com adição de alumínio foi adequado para a quantificação de ácido kójico em matéria-prima e em creme cosmético com ou sem adição de hidroquinona. É uma opção viável para laboratórios analíticos, sendo um método simples, rápido e econômico.

Palavras-chave: ácido kójico, alumínio, espectrofotometria, validação de método analítico, complexometria

ABSTRACT

Kojic acid (KA, 5-Hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4*H*-pyran-4-one), is an organic acid, commonly produced by species of *Aspergillus* sp. It had been first isolated by Saito (1907) and its name and structure were defined in 1924 by Jabuta. KA has several applications, among them, the most important are: in the food industry as antioxidant; public health in the treatment of diseases such as β -thalassemia and diabetes; in cosmetic industry as bleaching agent, since it inhibits the melanin synthesis.

The present work developed and validated a spectrophotometric method in the UV region by AK-Al complexation.

The method was based on the ability of the analyte to form complexes with metal ions and for this work Al^{3+} was chosen, because it does not show paramagnetic property, whereas this could interfere with the RMN analysis of complex. The solvent methanol was more appropriate to the analysis, since it allowed a greater bathochromic displacement and generate a clear solution of cosmetic cream, improving the extraction of analyte.

The AK- Al^{3+} complex was analyzed by UV, IR, potentiometric titration and NMR ^{13}C . By UV spectra a bathochromic shift was verified by adding aluminium in KA acidic solution. Was found by potentiometric titration that despite having two apparent shifts, the second derivative calculated confirmed that the KA has only one ionization, $\text{pK}_a = 7,68 \pm 0,02$. Adding aluminium there is complex formation, pH and molar dependent. The comparison of complexed (AK/ Al^{3+}) and non-complexed KA IR spectra, at different pH, allowed to correlate the changes in peaks absorption related to enolic (3200 e 1350 cm^{-1}) and carbonyl (1768 e 1700 cm^{-1}) groups. The carbon chemical shifts in non-complexed KA allowed to conclude that, varying the pH to an alkaline range, the C-2 shield and C-4 and C-5 deshielded occur by molecule rearrangement. By comparison of the chemical shifts of carbons in complexed and non-complexed KA (pH 4), only C-3 proved to be shielded, whereas C-2, C-4 and C-5 proved to be deshielded. From these results it was possible to suggest that the KA structures depend on the pH and molar ratio and to confirm the hydrogen output of the enolic hydroxyl and aluminum complexation between the carbonyl and enolic KA group. The complexes suggested by the potentiometric titration and infrared spectroscopy are consistent with the chemical shifts observed in the obtained NMR spectra. The results obtained by these techniques provided evidence of possible structures of KA in different pH and of the complex AK-Al. The data confirm the hydrogen output from enolic hydroxyl.

The spectrophotometric method developed based on the complexation AK: Al^{3+} , showed a good performance in the validation. This method yields linearity in the range of 5 and 50 $\mu\text{g/mL}$ of KA ($r = 0.9998$), selectivity, sensibility ($\text{DL} = 0,15\text{ }\mu\text{g/mL}$ and $\text{QL} = 0,46\text{ }\mu\text{g/mL}$) precision (RSD 0,402%, 1,284 and 1,192% for 10, 15 and 20 $\mu\text{g/mL}$ on repeatability; RSD 2,171, 0,976 and 0,440 for 10, 15 and 20 $\mu\text{g/mL}$ for intermediate precision), accuracy (recovery near 100%) and robustness (varying pH, temperature and time). The spectrophotometric UV method with the addition of aluminium is suitable for the quantification of kojic acid raw material and cosmetic cream with or without hydroquinone. Additionally the method takes advantage of simple and accessible reagents and equipment, while having a low operating cost.

Key-words: kojic acid, aluminum, spectrophotometry, validation of analytic method, complexometry

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – Camadas e componentes da pele	20
FIGURA 02 – Estrutura do tegumento	21
FIGURA 03 – Arquitetura da pele clara e escura	24
FIGURA 04 – Forma simplificada da formação da melanina.....	25
FIGURA 05 – Melanogênese com diferentes passos regulatórios	26
FIGURA 06 – Hiperpigmentação da pele pela estimulação da radiação solar	29
FIGURA 07 – Ilustração esquemática das possíveis abordagens para interferir com a via melanogênica	30
FIGURA 08 – Estrutura da hidroquinona.....	31
FIGURA 09 – Estrutura química do ácido kójico	32
FIGURA 10 – Possível biossíntese do ácido kójico a partir da glucose	32
FIGURA 11 – Possíveis reações na biossíntese do ácido kójico	33
FIGURA 12 – biossíntese do ácido kójico a partir da gluconolactona	33
FIGURA 13 – Modelo do complexo ácido kójico-cobre	35
FIGURA 14 – Regiões do espectro eletromagnético.....	38
FIGURA 15 – Estruturas esquemáticas da ligação do alumínio com citrato	41
FIGURA 16 – Ciclo de vida de um método de análise	47
FIGURA 17 – Fórmula da exatidão	50
FIGURA 18 – Fórmula do desvio padrão relativo.....	52
FIGURA 19 – Possível estrutura quelante do AK com um íon metálico.....	72
FIGURA 20 – Espectros de UV das soluções aquosa e metanólica de AK (15 µg/mL).....	74
FIGURA 21 – Espectro de UV da solução aquosa de AK (15 µg/mL) acidificada (pH 2,8) e alcalinizada (pH 10,5) de AK (15 µg/mL).....	74
FIGURA 22 – Espectro de UV da solução metanólica de AK (15 µg/mL) acidificada (pH 1,2) e alcalinizada (pH 9,5) de AK (15 µg/mL).....	74
FIGURA 23 – Espectros de UV de soluções metanólicas contendo AK 0,1-50 µg/mL e solução ácida de cloreto de alumínio	76
FIGURA 24 – Representação gráfica dos coeficientes de correlação versus comprimento de onda do conjunto de soluções metanólicas deAK 0,1-50 µg/mL em solução ácida de cloreto de alumínio 0,2%	76
FIGURA 25 – Região de maior (A) e menor (B) probabilidade de estar envolvida na ligação AK com íons metálicos.....	77
FIGURA 26 – Espectro de UV da solução aquosa e metanólica de AK (15 µg/mL) com solução ácida de AlCl ₃ 0,2%.....	78
FIGURA 27 – Estruturas químicas do metilparabeno (A) e propilparabeno (B)	79
FIGURA 28 – Espectro de UV de soluções metanólicas com AK (15 µg/mL), creme lanette contendo AK 2% em associação ou não com HQ 4% e somente creme lanette, todos com adição de AlCl ₃ 0,2%	80
FIGURA 29 – Espectro de UV da solução metanólica do AK (15 µg/mL) com cloreto de alumínio em comparação com espectros de absorção da hidroquinona e nipazol em metanol	81
FIGURA 30 – Gráfico da absorbância das soluções na variação molar de AK (15 µg/mL) com cloreto de alumínio (0,2%) em 305 nm.....	82
FIGURA 31 – Espectros de UV de soluções metanólicas com AK e AlCl ₃ em diferentes relações molares.....	83
FIGURA 32 – Resultado da avaliação da linearidade do método espectrofotométrico de AK com AlCl ₃ de 5-50 µg/mL em 305 nm no meio metanólico	84

FIGURA 33 – Resultado da avaliação da linearidade do método espectrofotométrico de AK com AlCl_3 de 10-20 $\mu\text{g/mL}$ em 305 nm no meio metanólico ...	84
FIGURA 34 – Resultado da avaliação da linearidade do método espectrofotométrico pela recuperação de AK em creme Lanette com AlCl_3 de 5-30 $\mu\text{g/mL}$ em 305 nm no meio metanólico.....	85
FIGURA 35 – Resultado da avaliação da linearidade do método espectrofotométrico pela recuperação de AK em presença de hidroquinona em creme Lanette com AlCl_3 de 5-30 $\mu\text{g/mL}$ em 320 nm no meio metanólico ...	85
FIGURA 36 – Representação da hipotética dissociação do ácido kójico	98
FIGURA 37 – Estruturas da coordenação do AK com magnésio	98
FIGURA 38 – Curva de titulação do ácido kójico não complexado	100
FIGURA 39 – Espectros de UV do ácido kójico não complexado em solução aquosa (15 $\mu\text{g/mL}$) na variação de pH de 2,0 a 12,0 e identificação dos pontos isobésticos	101
FIGURA 40 – Espectros de UV do ácido kójico não complexado em solução aquosa (15 $\mu\text{g/mL}$) na variação de pH de 2,0 a 12,0 e identificação dos pH no $\lambda = 270$ nm depois do primeiro ponto isobéstico	101
FIGURA 41 – Espectros de UV do ácido kójico não complexado em solução aquosa (15 $\mu\text{g/mL}$) na variação de pH de 2,0 a 12,0 e identificação dos pH no $\lambda = 315$ nm depois do segundo ponto isobéstico	102
FIGURA 42 – Gráfico da segunda derivada da titulação potenciométrica do AK não complexado	103
FIGURA 43 – Estrutura do ácido kójico com os carbonos assinalados.....	103
FIGURA 44 – Diagrama de especiação do AK não complexado em meio aquoso	104
FIGURA 45 – Curva de titulação na proporção AK 1:1 Alumínio em meio aquoso	105
FIGURA 46 – Espectros de UV do ácido kójico 1:1 alumínio em solução aquosa (15 $\mu\text{g/mL}$) na variação de pH de 2,0 a 12,0 e identificação dos pontos isobésticos	106
FIGURA 47 – Diagrama de especiação da proporção AK 1:1 Alumínio.....	107
FIGURA 48 – Curvas de titulação do AK não complexado (0,1 mmol) e nas e nas proporções AK 1:0,5 Al e AK 1:1 Al em solução aquosa.....	111
FIGURA 49 – Reações graduais de hidrólise do complexo Fe(III) 1:1 AK	112
FIGURA 50 – Reações graduais de hidrólise do complexo Fe(III) 2:1 AK	112
FIGURA 51 – Espectros de absorção do AK matéria-prima em comparação com o AK padrão na região do infravermelho	115
FIGURA 52 – Espectros de absorção do ácido kójico padrão e a partir de soluções pH 9 e 14 na região do infravermelho	116
FIGURA 53 – Espectros de absorção do complexo ácido kójico / alumínio a partir de soluções nos pH 1, 11 e 14 na região do infravermelho.....	117
FIGURA 54 – Espectros de absorção do ácido kójico puro em comparação com o complexo AK/Alumínio a partir de soluções nos pH 1, 11 e 14 na região do infravermelho	119
FIGURA 55 – Espectros de absorção do ácido kójico pH 14 em comparação com o complexo AK/Alumínio pH 14 na região do infravermelho	119
FIGURA 56 – Possíveis estruturas de ressonância do ácido kójico	121
FIGURA 57 – Possível estrutura de ressonância do ácido kójico complexado	121
FIGURA 58 – Espectros de RMN e os dados obtidos em pH 4, 7 e 11 do AK não complexado	122
FIGURA 59 – Estruturas hipotéticas da ressonância do AK na forma ácida (A) e básica (B)	123

FIGURA 60 – Estruturas hipotéticas de uma das representações do ácido kójico complexado em pH 4.....	125
FIGURA 61 – Estrutura química do AK com os assinalamentos por RMN ¹³ C em Me ₂ SO-d ₆	125

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01 – Regiões do UV e IV do espectro eletromagnético	39
QUADRO 02 – Classificação dos métodos analíticos de acordo com a finalidade ..	47
QUADRO 03 – Ensaios necessários para a validação de métodos analíticos de acordo com a finalidade	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – Relações molares entre o ácido kójico e o alumínio	70
TABELA 02 – Valores de concentração de AK e erro relativo na avaliação da repetitividade	87
TABELA 03 – Valores de concentração de AK e erro relativo na avaliação da precisão intermediária	88
TABELA 04 – Valores de concentração de AK no ensaio de recuperação em creme lanette e erro relativo	89
TABELA 05 – Valores de concentração de AK em presença de hidroquinona no ensaio de recuperação em creme lanette e erro relativo.....	90
TABELA 06 – Valores de concentração de AK no ensaio de recuperação em creme não iônico e erro relativo	91
TABELA 07 – Valores de concentração de AK em presença de hidroquinona no ensaio de recuperação em creme não iônico e erro relativo	91
TABELA 08 – Resultado do ensaio de robustez pela avaliação do tempo.....	93
TABELA 09 – Resultado do ensaio de robustez pela avaliação da temperatura	94
TABELA 10 – Resultado do ensaio de robustez pela avaliação do pH.....	95
TABELA 11 – Comparação entre as soluções de AK puro e complexado com alumínio para os valores de absorbância em comprimentos de onda e diferentes valores de pH.....	108
TABELA 12 – Constantes do do ácido kójico em meio aquoso em várias proporções molares com alumínio.....	109
TABELA 13 – Picos mais significativos no espectro de infravermelho da variação de pH do ácido kójico puro e do complexo AK/Alumínio	120
TABELA 14 – Picos significantes no espectro de infravermelho de alguns quelatos de ácido kójico.....	120
TABELA 15 – Valores dos deslocamentos químicos dos carbonos do ácido kójico não complexado em diversos pH	123
TABELA 16 – Comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos do AK pela variação de pH	123
TABELA 17 – Valores dos deslocamentos químicos dos carbonos do ácido kójico complexado com alumínio em pH 2 e 4	124
TABELA 18 – Comparação dos deslocamentos químicos dos carboos do AK puro e complexado com alumínio em pH 4	124
TABELA 19 – Comparação dos dados de assinalamentos dos carbonos do AK por RMN ¹³ C da literatura e dos obtidos no presente trabalho	126

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AK	- Ácido Kójico
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CV	- Coeficiente de variação
COSY	- Espectroscopia de correlação
DEPT	- Reforço por transferência de polarização sem distorção
DP	- Desvio padrão
DPR	- Desvio padrão relativo
DPR%	- Desvio padrão relativo percentual
FDA	- Food and drug administration
HMBC	- Experimento de correlação para ligações heteronucleares múltiplas
HPLC	- Cromatografia Líquida de Alta Pressão ou Eficiência
HQ	- Hidroquinona
ICH	- International Conference on Harmonisation
IUPAC	- International Union of Pure and Applied Chemistry
INMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ML	- Metal-ligante
RMN	- Ressonância magnética nuclear
R	- Coeficiente de correlação
r^2	- Coeficiente de determinação
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
USP	- United States Pharmacopeia
UV/Vis	- Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE QUADROS	12
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 PELE	20
2.1.1 Epiderme	21
2.1.2 Derme	22
2.1.3 Melanócito	23
2.1.4 Melanina	24
2.1.5 Eumelanina e feomelanina	25
2.1.6 Tirosina	27
2.1.7 Tirosinases	27
2.2 PIGMENTAÇÃO DA PELE	28
2.3 HIPERPIGMENTAÇÃO DA PELE	28
2.4 TRATAMENTO	29
2.4.1 Ácido Kójico	32
2.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE AK	36
2.5.1 Espectroscopia eletrônica	38
2.5.1.1 Complexometria	40
2.5.2 Espectroscopia no infravermelho	42
2.5.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	43
2.5.4 Titulação potenciométrica	44
2.6 VALIDAÇÃO	45
2.6.1 Seletividade / especificidade	48
2.6.2 Linearidade e intervalo	49
2.6.3 Exatidão	50
2.6.4 Precisão	51
2.6.4.1 Repetitividade	52
2.6.4.2 Precisão intermediária	52
2.6.4.3 Reprodutibilidade	52
2.6.5 Robustez	53
2.6.6 Sensibilidade	53
3. OBJETIVOS	55
3.1 OBJETIVO GERAL	55
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
4. MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL	57
4.2 MATERIAL	57
4.2.1 Materiais e reagentes	57
4.2.2 Equipamentos	58
4.3 MÉTODOS	58
4.3.1 Desenvolvimento do método	58
4.3.1.1 Escolha do solvente e influência do pH	59
4.3.1.2 Avaliação da seletividade	59
4.3.1.3 Influência da proporção AK e $AlCl_3$ na intensidade de absorção	60

4.4	VALIDAÇÃO	61
4.4.1	Linearidade e intervalo	61
4.4.2	Sensibilidade	62
4.4.3	Precisão	62
4.4.3.1	Repetitividade.....	62
4.4.3.2	Precisão intermediária.....	62
4.4.4	Exatidão	63
4.4.5	Robustez	63
4.4.5.1	Influência do tempo de leitura na intensidade de absorção.....	64
4.4.5.2	Influência da temperatura na intensidade de absorção	64
4.4.5.3	Influência do pH na intensidade de absorção.....	64
4.4.5.4	Influência da concentração do metal na intensidade de absorção	65
4.5	ESTUDO DO COMPLEXO	65
4.5.1	Espectroscopia no infravermelho (IV).....	65
4.5.2	Ressonância magnética nuclear.....	65
4.5.3	Titulação Potenciométrica	66
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1	CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS.....	72
5.2	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO.....	73
5.2.1	Escolha do solvente e influência do pH.....	73
5.2.2	Seleção do comprimento de onda	75
5.2.3	Avaliação da seletividade	76
5.2.4	A proporção molar AK e alumínio.....	82
5.3	VALIDAÇÃO	83
5.3.1	Linearidade e intervalo	84
5.3.2	Sensibilidade	86
5.3.3	Precisão	87
5.3.3.1	Repetitividade.....	87
5.3.3.2	Precisão intermediária.....	88
5.3.4	Exatidão	89
5.3.5	Robustez	92
5.3.5.1	Influência do tempo de leitura na intensidade de absorção.....	92
5.3.5.2	Influência da temperatura na intensidade de absorção	94
5.3.5.3	Influência do pH na intensidade de absorção.....	95
5.3.5.4	Influência da concentração do metal na intensidade de absorção	96
5.4	ESTUDO DO COMPLEXO	97
5.4.1	Titulação potenciométrica e espectroscopia no ultravioleta	97
5.4.2	Espectroscopia no infravermelho	112
5.4.3	Ressonância magnética nuclear.....	122
6.	CONCLUSÃO	128
	REFERÊNCIAS.....	131

Introdução

1. INTRODUÇÃO

No mundo contemporâneo a preocupação com a aparência física se intensificou, muito em busca de uma aceitação e valorização pelos diversos contextos sociais. Parte disso potencializado pela “necessidade” de adequação aos padrões e modelos de comportamento valorizados pela sociedade. Qualquer detalhe estético que esteja fora do padronizado pode ser sinônimo de rejeição.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a proporção de idosos, no Brasil, vem se elevando e com o passar da idade começam a ocorrer, em maior proporção, problemas como a disfunção das camadas da pele, somados a outros fatores como os genéticos, ambientais, climáticos. As manchas que ocorrem na pele, dentre elas principalmente as que ocorrem na face, podem gerar problemas relacionados ao bem-estar dos indivíduos, quando estes se apresentam perante a sociedade. Segundo RUIZ-MALDONADO; OROZCO-COVARRUBIAS (1997) mesmo uma alteração mínima da pigmentação da pele pode resultar num interesse estético maior, com implicações psicológicas. Corroborando com essa idéia, ISHIKAWA (2007) afirma que uma hiperpigmentação indesejada pode também produzir um significativo stress psicológico. Além do lado pessoal, há dados de estudos econômicos dentro do nosso país em que se constata que num universo de 57343 consultas pesquisadas, os transtornos da pigmentação somaram 4822 casos, o que corresponde a 8,4% das principais causas de consultas registradas (PENNA; RAMOS; CAFÉ, 2006) e isto representa um custo significativo ao sistema de saúde nacional.

As hiperpigmentações são, em geral, distúrbios caracterizados pelo aumento de melanina e outros pigmentantes na pele (SATO *et al.*, 2007). O tratamento se faz basicamente com o uso de agentes clareadores químicos, como por exemplo, o ácido kójico (AK). Ele é comumente usado na indústria de cosméticos devido às suas propriedades de absorção de radicais livres e inibição da produção de melanina (ZBOROWSKI; GRYBOS; PRONIEWICZ, 2003). A atividade clareadora pode ser devido a uma lenta e reversível inibição competitiva da tirosinase (NOHYNEK *et al.*, 2004), principal grupo de enzimas responsável pela conversão da tirosina em melanina.

Segundo BRENNER (2008), a modificação da pigmentação da pele desperta grande interesse farmacêutico e como acredita CURTO *et al.* (1999) há uma demanda no mercado global que tem se desenvolvido recentemente para agentes clareadores da pele como produtos cosméticos da “ vaidade”.

Sob esse contexto há uma preocupação da indústria farmacêutica em atender esse grupo de pessoas que são acometidas por distúrbios de pele como as hiperpigmentações do tipo melânica. Com o crescimento dessa demanda, há a necessidade de se verificar a qualidade das matérias-primas e dos produtos. E com isso são constantes os desafios da tecnologia analítica que precisa disponibilizar métodos confiáveis, de baixo custo, simples e acessíveis aos diferentes segmentos do mercado.

Para o ácido kójico, não foi encontrado nenhum método de quantificação e análise descrito na literatura oficial (farmacopéias). Entretanto, na literatura científica encontram-se descritos alguns métodos de quantificação propostos por cromatografia líquida de alta eficiência (LIN; WU; HUANG, 2007), eletroforese capilar (LIN; YANG; WU, 2007) e espectroscopia eletrônica (GOMARA *et al.*, 2004), sendo os dois primeiros aplicados a produtos em associações e o último aplicado somente para a matéria-prima. Os métodos por HPLC e Eletroforese não são métodos simples e não são de fácil aquisição para as farmácias de manipulação - que são grandes produtoras destes produtos despigmentantes - o que se constitui numa dificuldade para que estes estabelecimentos realizem o controle de qualidade destes produtos. A falta de qualidade destes produtos pode trazer problemas como ineficiência do tratamento; podendo também ocorrer agravamento do seu problema de saúde ou a geração de um novo, ou prolongar o tempo de tratamento caso a concentração seja diferente da declarada ou recomendada. O controle de qualidade da matéria-prima ou dos produtos tornou-se uma ferramenta imprescindível na indústria química, alimentícia e farmacêutica. O processo de validação é o mecanismo utilizado para garantir maior confiabilidade nos resultados.

No presente trabalho foi desenvolvido e validado um método por espectroscopia no UV para quantificação do analito na matéria-prima e creme cosmético.

A presente pesquisa visa contribuir com o avanço da tecnologia analítica, disponibilizando um método para quantificar AK na rotina do controle de qualidade, método esse que minimize os custos e o tempo da análise.

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PELE

As camadas da pele são representadas pela epiderme, derme e hipoderme. Esta consiste em tecido gorduroso que conecta a derme aos componentes esqueléticos subjacentes (COSTIN; HEARING, 2007) como representada na figura 1. Na estrutura *A* pode-se observar as três diferentes camadas e seus componentes. Na estrutura *B* estão representadas quatro camadas da epiderme: estrato basal, espinhoso, granuloso e córneo. Pode-se também observar as formas dos melanócitos bem como dos queratinócitos.

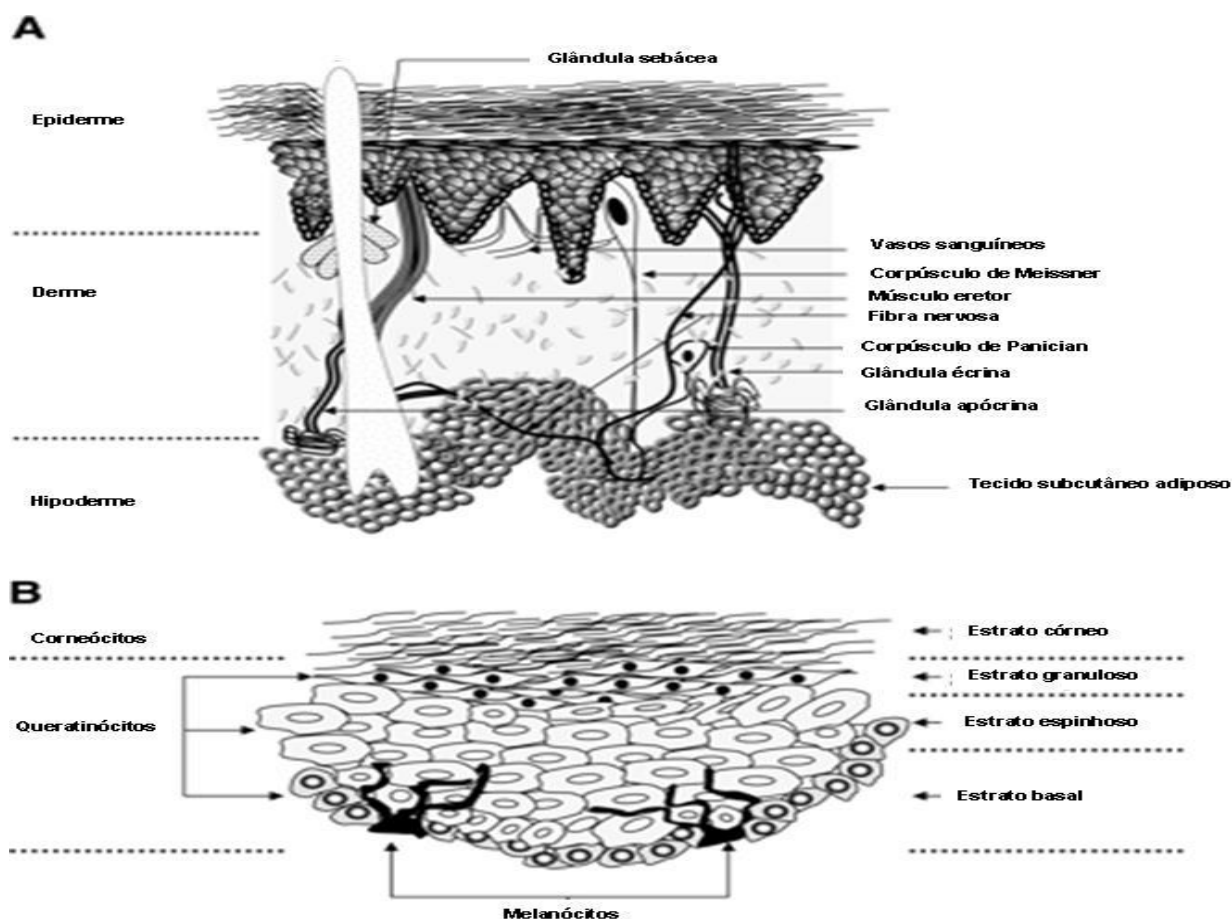


FIGURA 1 – CAMADAS E COMPONENTES DA PELE
FONTE: ADAPTADA DE COSTIN; HEARING, 2007

Na figura 2 pode-se observar a divisão estrutural da epiderme e derme com seus corpos funcionais.

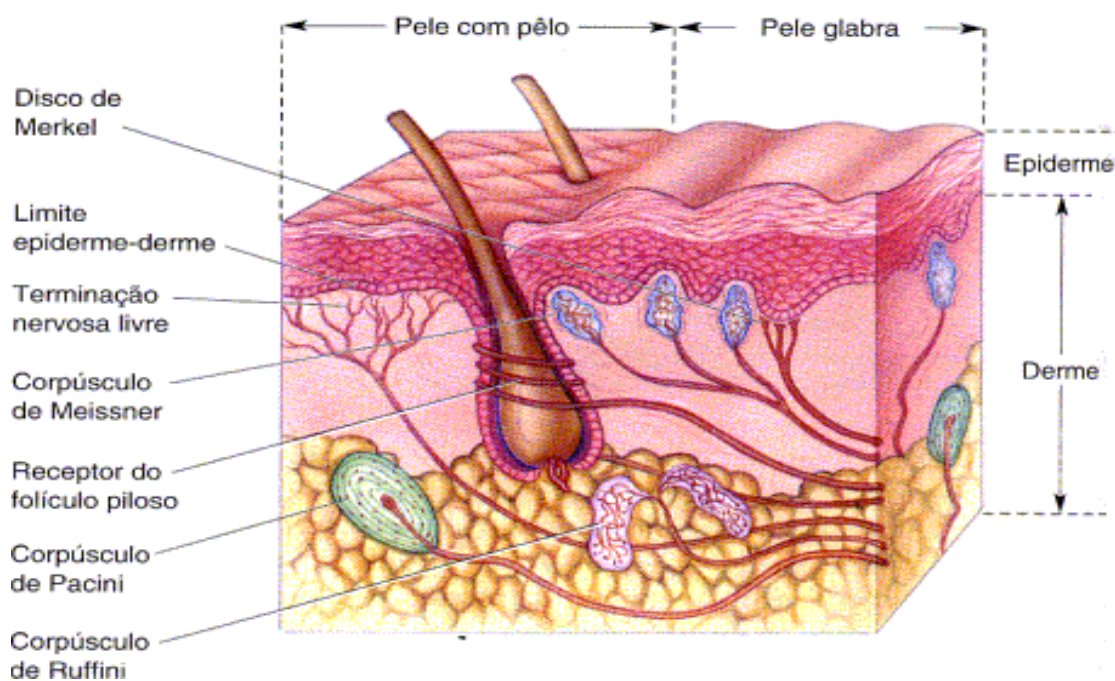


FIGURA 2 – ESTRUTURA DO TEGUMENTO
 FONTE: BEAR; CONNORS; PARADISO, 2002

2.1.1 Epiderme

A epiderme é a camada mais externa, de epitélio estratificado desprovido de sangue ou nervos. É um epitélio escamoso estratificado queratinizado (MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS, 2007; POWELL, 2007). Compreende camadas de células estreitamente empacotadas produzidas pela divisão celular da camada celular basal (POWELL, 2007). É composta de várias populações celulares distintas: queratinócitos e melanócitos são os constituintes principais, dos quais o primeiro compreende cerca de 95% (COSTIN; HEARING, 2007; MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS, 2007) da epiderme. Melanócitos correspondem de 1 a 2% da epiderme (MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS, 2007).

Os queratinócitos sintetizam queratina, a principal proteína estrutural da epiderme (POWELL, 2007) e, também, citocinas, que são mediadores químicos secretados por células ativadas que afetam outras células. A produção de citocinas é estimulada pela injúria, incluindo aquela causada por radiação UV (POWELL, 2007).

A sua função principal é proteger o corpo de estímulos prejudiciais do meio ambiente e diminuir a perda de fluidos (MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS, 2007).

Pode-se dividir a epiderme em quatro ou cinco camadas ou estratos: estrato germinativo, espinhoso, granuloso, lúcido (no qual o queratinócito gradualmente migra para a superfície num processo chamado “descamação”) e estrato córneo (MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS, 2007) como representa a figura 1-B.

Estrato basal é também conhecido como estrato germinativo, é uma camada simples de células unidas a uma membrana não celular que separa a epiderme da derme. Consiste na sua maior parte de queratinócitos e no mínimo dois tipos diferentes de células derivadas das cristas neurais - células Merkel e os melanócitos (COSTIN; HEARING, 2007)

O próximo nível na epiderme é a camada espinhosa, assim chamada por causa das células que estão unidas coesivamente por desmossomos que se assemelham a espinhos em microscopia (POWELL, 2007). Ele contém queratinócitos poliédricos irregulares com capacidade limitada para a divisão celular (COSTIN; HEARING, 2007).

Estrato granuloso contém queratinócitos achatados, poliédricos e sem divisão produzindo grânulos de proteínas chamadas de queratohialinas. (COSTIN; HEARING, 2007). Como o queratinócito se move para cima, começa a fazer parte da camada granular, duas ou três camadas de células planas contendo muitos grânulos. Estes são lisossomos que contém enzimas hidrolíticas que destroem o núcleo e outras organelas, resultando na morte celular (POWELL, 2007).

Estrato córneo é a camada mais superior da epiderme e consiste em células achatadas, mortas, sem núcleo e com grossas membranas celulares que se aderem umas às outras. Gradualmente essas células são substituídas por células subjacentes. A camada córnea é uma efetiva barreira para a maioria dos microrganismos, químicos e fluídos, embora seja permeável a algumas substâncias (COSTIN; HEARING, 2007; POWELL, 2007).

2.1.2 Derme

A derme é uma camada de tecido conectivo (COSTIN; HEARING, 2007; MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS, 2007) à epiderme. Situa-se abaixo da mesma e suporta-a estruturalmente e na sua nutrição. O componente principal é o fibroblasto e o colágeno que ele produz. Essa camada assume a importante função de

termorregulação e suportar a rede vascular para suprir a epiderme com nutrientes (MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS, 2007).

2.1.3 Melanócito

Melanócitos são inicialmente derivados da crista neural (DEL MARMOL *et al.*, 1993; STULBERG; CLARK; TOVEY, 2003; SLOMINSKI *et al.*, 2004) e durante o desenvolvimento embrionário (HEARING; TSUKAMOTO, 1991; TSATMALI; ANCANS; THODY, 2002), melanoblastos migram para a ectoderme (POWELL, 2007), epiderme (TAYLOR, 2002) ou lugares apropriados (YAMAGUCHI; BRENNER; HEARING, 2007). Uma vez que eles alcançaram o destino final se diferenciam em melanócitos, os quais no sexto mês de vida fetal, aproximadamente, estão prontos e estabelecidos nas junções dermal-epidermal (COSTIN; HEARING, 2007). São capazes de produzir melanina e distribuí-la através de seus dendritos para os queratinócitos ao redor, por isso funcionam como componentes chave na pigmentação (TSATMALI; ANCANS; THODY, 2002). Melanócitos epidermais proliferam-se lentamente e são bem resistentes a apoptose (YAMAGUCHI; BRENNER; HEARING, 2007).

Queratinócitos e melanócitos formam uma unidade funcional conhecida como melanina epidérmica. Interação intimamente para produzir e distribuir melanina na pele humana durante o processo de pigmentação, de tal modo que enquanto os queratinócitos produzem fatores parácrinos que afetam a proliferação dos melanócitos, dendritos e síntese de melanina, os melanócitos controlam a síntese de melanina e a transferem para um queratinócito adjacente (AHN *et al.*, 2003).

YAMAGUCHI (2007) afirmou que os melanócitos epidermais e queratinócitos basais podem ocorrer numa proporção de cerca de 1:10 e a distribuição de melanina que eles produzem pode ser visualizada na figura 3. Através desta também pode-se notar também o grau de penetração da radiação UV em indivíduos de pele clara e escura, sendo que nos primeiros é maior pelo menor número de pigmentos responsáveis pela absorção dessa radiação. Nos negros a radiação UV atinge no máximo o estrato espinhoso, enquanto que nos brancos atravessa a membrana basal da epiderme e atinge a derme.

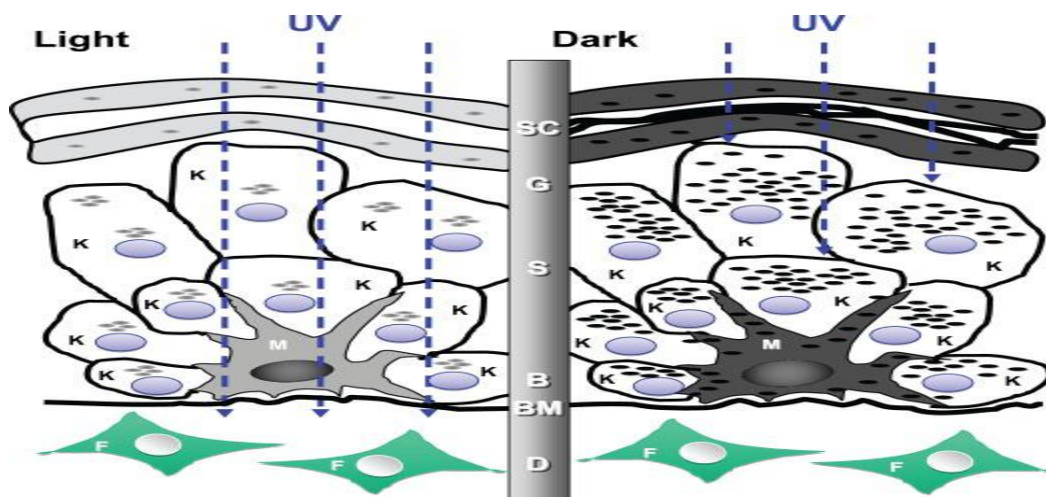


FIGURA 3 - ARQUITETURA DA PELE CLARA E ESCURA

SC: Estrato córneo; G: Estrato granuloso; S: Estrato espinhoso; B: Estrato basal; BM: Membrana basal; D: Derme; K: queratinócitos; M: Melanócitos; F: fibroblasto (ovalado)

FONTE: ADAPTADA DE YAMAGUCHI; BRENNER; HEARING (2007)

2.1.4 Melanina

A melanina é um biopolímero (HEARING; TSUKAMOTO, 1991; COSTIN; HEARING, 2007; HERRLING; JUNG; FUCHS, 2008) nitrogenado (JONES *et al.*, 2002) fenólico (CHOI *et al.*, 2006; PLONKA; GRABACKA, 2006), granular extremamente insolúvel (SCHMIDT; KRIEN; RÉGNIER, 1996), produzido por células dendríticas especializadas, melanócitos - que estão localizadas primariamente na pele, bulbo capilar e olhos (HEARING; TSUKAMOTO, 1991) - através de uma via enzimática (STURM; TEASDALE; BOX, 2001) como está sucintamente representada na figura 4. Essa via envolve uma série de eventos celulares complexos (ARCANS *et al.*, 2001). Dentro dos melanócitos a melanina está ligada a uma proteína matriz para formar melanossomos (WILKINSON; MOORE 1990). Uma vez produzida, os melanossomos são transferidos até os queratinócitos adjacentes (TSATMALI; ANCANS; THODY, 2002; HOOGDUIJN *et al.*, 2004). São poliânions com um relativo alto teor de carga negativa por apresentar grupo carboxil e o-semiquinonas (FELIX *et al.*, 1978) e são moléculas de alto peso molecular, formada pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos (FOGARTY; TOBIN, 1996), se concentra nos melanossomos (JONES, 2002) e é amplamente distribuída na natureza (CHOI *et al.*, 2006). Ela é encontrada em bactérias, fungos, plantas e animais (MOMTAZ; LALL; BASSON, 2008). A produção parece ser controlada por fatores relacionados à presença ou falta de luz. Fatores relacionados à luminosidade incluem epinefrina,

noraepinefrina e melatonina. Os outros fatores com a falta de luminosidade incluem estimulação do hormônio melanocítico, andrógeno e estrógeno (ABDEL-WANIS; NAWAHARA, 2003). O estímulo melanogênico é através do hormônio estimulante de melanócito (MSH) (HEARING; TSUKAMOTO, 1991).

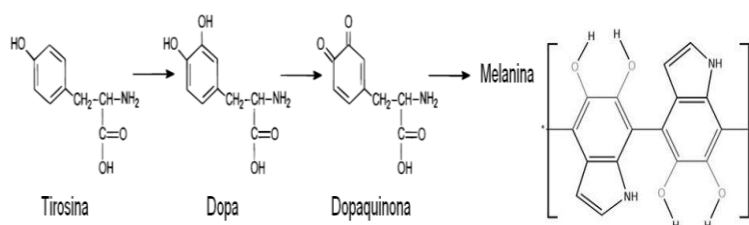


FIGURA 4 - FORMA SIMPLIFICADA DA FORMAÇÃO DA MELANINA
FONTE: ADAPTADO DE FRIEDMAN (1996)

Ela atua como um filtro fotoprotetor ótico e químico, o qual reduz a penetração de todos os comprimentos de luz até tecidos subepidermais (JABLONSKI; CHAPLIN, 2000). Uma das principais funções biológicas é a fotoproteção via absorção óptica e espalhamento da radiação UV (SCHMIDT; KRIEN; RÉGNIER, 1996), sendo um mecanismo de defesa primário (KANG *et al.*, 2009).

A existência de melanina na pele é altamente correlacionada com a prevenção de radicais livres / ROS (espécies reativas de oxigênio) gerados pela radiação UV. Especialmente na pele, a melanina assegura a proteção natural eliminando esses radicais livres gerados (HERRLING; JUNG; FUCHS, 2008). Além desse possível papel ela pode atuar como um sequestrante de agentes citotóxicos como os íons metálicos, uma vez que estes têm propriedades catiônicas e se ligariam por interação iônica (LARSSON, 2006). A melanina é um dos fatores mais importantes na determinação da coloração da pele (SAKUMA *et al.*, 1999). O acúmulo de certos agentes químicos no tecido com pigmentação, devido a afinidade à melanina, é possivelmente o mecanismo de retenção mais pronunciado do corpo (LARSSON, 2006).

2.1.5 Eumelanina e feomelanina

Em humanos, melanina é classificada em dois tipos gerais: eumelanina é um biopolímero nitrogenado polimorfo preto ou marrom e altamente associado a proteínas através de ligações covalentes (SLOMINSKI *et al.*, 2004); A feomelanina

vermelha ou amarela, colorida pela polimerização incorporada de precursores de conjugados de cisteína (NAITO *et al.*, 2007) e fortemente ligada a proteínas, o que indica que ela ocorre como uma cromoproteína com alta variabilidade no número de em nitrogênio e enxofre (SLOMINSKI *et al.*, 2004).

Já BRENNER (2008) considera que há três tipos de melanina: feomelanina (vermelha/amarela) e dois tipos de eumelanina. A pele humana contém uma mistura dos três tipos, mas as proporções variam enormemente e determinam a cor da pele.

Ainda de acordo com BRENNER (2008), dentro dos melanosomos, no mínimo três enzimas são indispensáveis para a síntese dos diferentes tipos de melanina:

- Tirosinase (TYR), Eumelanina 5,6-dihidroxiindole (DHI) e Proteína Tirosinase-RELATED 1 (TYRP1).

Segundo PROTA (2001) além do modo da polimerização do DHI e o seu derivado 2-carboxil, DHICA, e os fatores controlando o modelo de rearranjo do dopacromo, os principais destaques deste esquema incluem o papel da peroxidase na polimerização do DHI e os efeitos regulatórios de íons metálicos e, diferentes estágios da melanogênese, nomeadas como ativação da tirosinase, rearranjo de dopacromo e polimerização do DHI. O esquema pode ser visualizado pela figura 5.

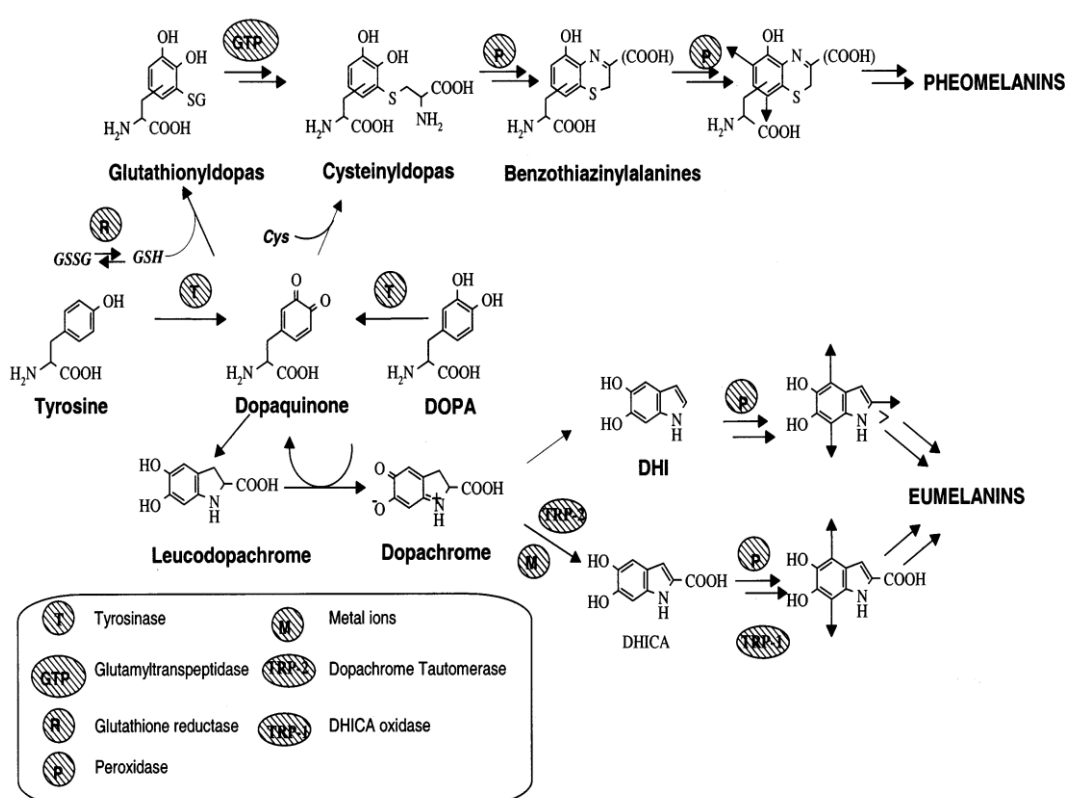


FIGURA 5 - MELANOGÊNESE COM OS DIFERENTES PASSOS REGULATÓRIOS
FONTE: PROTA (2001)

2.1.6 Tirosina

Tirosina não permeia livremente através dos lipídios biliares e o mecanismo para o transporte do substrato inicial para a melanogênese para o seu compartimento catalítico é desconhecido (STURM; TEASDALE; BOX, 2001).

Estudos indicam que há dois sítios catalíticos diferentes para tirosina e dopa (HEARING; EKEL, 1976) e um aumento na concentração intracelular de ambos resulta no aumento da melanogênese.

2.1.7 Tirosinases

Tirosinases ou polifenoloxidasas são proteínas amplamente distribuídas na escala filogenética e é responsável pela melanização nos animais e escurecimento das plantas (CABANES; CHAZARRA; GARCIACARMONA, 1994) e frutas (HYUN *et al.*, 2008). São enzimas do tipo monooxigenase (STURM; TEASDALE; BOX, 2001) que pertencem a uma família de proteínas que tem o centro catalítico formado por cobre (MATOBA *et al.*, 2006) e catalisam a orto-hidroxilação dos monofenóis e a subsequente oxidação dos produtos difenólicos em correspondentes quinonas (TEPPER; BUBACCO; CANTERS, 2002). Ela contribui direcionando a formação de pigmentos nos corpos dos mamíferos tanto quanto nas plantas, microrganismos e fungos (MOMTAZ; LALL; BASSON, 2008). É uma enzima limitante para a melanogênese (HEARING; TSUKAMOTO, 1991; TSATMALI; ANCANS; THODY, 2002) na conversão de tirosina em dopaquinona (AHN *et al.*, 2003). Ela é crítica na formação dos dois subtipos de melanina (TAYLOR, 2002) e é a lesão chave em muitos tipos de albinismo (HEARING; TSUKAMOTO, 1991).

Inibidores das tirosinases são agentes químicos capazes de reduzir reações enzimáticas, como a melanização da pele humana e escurecimento dos alimentos. O controle da sua atividade é importante na prevenção da síntese de melanina no escurecimento de alimentos (QIU *et al.*, 2009). Compostos naturais como vitamina C e AK são inibidores representativos da supressão melanogênica (UM *et al.*, 2003). Ela também pode ser inibida por aldeídos aromáticos e ácidos aromáticos (QIU *et al.*, 2009). Por isso, é grande o interesse por moléculas que tenham a propriedade da inibição da tirosinase para campos como a cosmética e agricultura.

Íons metálicos têm três modelos principais de participação nos processos biocatalíticos: orientação adequada do substrato alvo no estado de transição; mediação nas reações de redução/oxidação; estabilização eletrostática ou blindamento de cargas negativas (STENSON; CIOFFI, 2007).

2.2 PIGMENTAÇÃO DA PELE

Os pigmentos visíveis são sintetizados pelos melanócitos. Durante o desenvolvimento embrionário as células melanocíticas precursoras (melanoblasto) migram das cristas neurais para a pele, olhos e então são diretamente responsáveis pelas características de cor (STURM; TEASDALE; BOX, 2001). A pigmentação da pele é considerada o sinal universal de juventude e beleza (RESZKO; BERSON; LUPO, 2009). É resultado da síntese e distribuição de melanina (NAITO *et al.*, 2007), começando pela oxidação da tirosina em dopaquinona catalisada pela tirosinase (CHOI *et al.*, 2006).

O tamanho e o número das organelas são importantes na determinação da pigmentação. Melanossomos na pele de negros são maiores que seus homólogos na pele de brancos e estão armazenados como simples unidades em vez de grupos. Isto tem o efeito de retardar a degradação nos queratinócitos e contribui para um maior nível de pigmentação da pele (TSATMALI; ANCANS; THODY, 2002). Melanócitos escuros exibem uma taxa de síntese de aproximadamente três vezes mais melanina que os melanócitos de caucasianos (SCHMIDT; KRIEN; RÉGNIER, 1996).

2.3 HIPERPIGMENTAÇÃO DA PELE

RUIZ-MALDONADO (1997) afirmou que embora hiperpigmentação seja um termo frequentemente usado como um sinônimo para hipermelanose, esta se refere a um aumento relacionado à melanina e aquela a um aumento da pigmentação sem qualquer controle. O acúmulo excessivo de pigmentação epidermal pode causar várias desordens de hiperpigmentação (KANG *et al.*, 2009).

Vários são os fatores que podem desencadear processos de hiperpigmentação da pele, como por exemplo: Pinealectomia (ABDEL-WANIS; NAWAHARA, 2003); durante terapia antimalárica (é reportada entre 10-25% dos

pacientes) (SELVAAG, 1996); Sob o estímulo de hormônios, irritação, ou idiopaticamente em algumas desordens, hiperplasia dos melanócitos (STULBERG; CLARK; TOVEY, 2003); em resposta à exposição ao sol (STULBERG; CLARK; TOVEY, 2003; COSTIN; HEARING, 2007; BRENNER; HEARING, 2008), como pode ser observado na figura 6; inflamações da pele tais como eczema, dermatite de contato alérgico e irritante (HALDER; RICHARDS, 2004); psoríase, queimadura, radioterapia, etc (RUIZ-MALDONADO; OROZCO-COVARRUBIAS, 1997); uma ampla variedade de fármacos como antibióticos e quimioterápicos (BRENNER; HEARING, 2008).

Pigmentações epidermais devido à queimaduras solares, sardas, manchas senis são consideradas como causadas por um desequilíbrio entre a síntese e excreção de melanina, resultando em um aumento anormal (SAKUMA *et al.*, 1999).

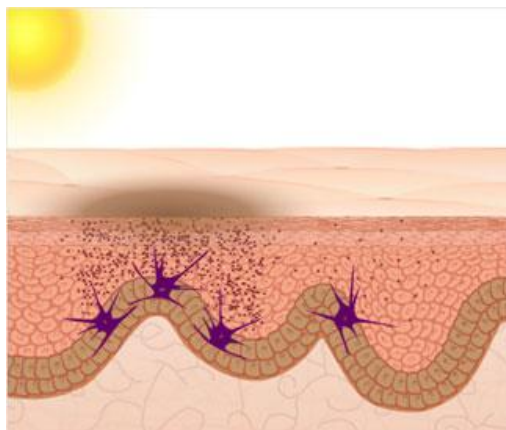


FIGURA 6 – HIPERPIGMENTAÇÃO DA PELE PELA ESTIMULAÇÃO DA RADIAÇÃO SOLAR
FONTE: ASTISTRY (2009)

2.4 TRATAMENTO

O despigmentante ideal deveria ter um efeito clareador potente, rápido e seletivo sobre os melanócitos hiperativados, não ocasionar a curto ou a longo prazo efeitos colaterais e remover permanentemente o pigmento indesejado, agindo em um ou mais passos no processo de pigmentação (BRIGANTI; CAMERA; PICARDO, 2003). Podem-se ter diversos mecanismos para despigmentação da pele como, por exemplo: destruir seletivamente os melanócitos; inibir a formação de melanossomas e alterar sua estrutura; inibir a biossíntese da tirosina; inibir a formação da melanina; interferir com a transferência de melanossomas; ter um efeito químico sobre a melanina ou aumentar a degradação de melanossomas em queratinócitos (WILKINSON; MOORE 1990; PANDYA; GUEVARA, 2000). A figura 7 apresenta de

forma resumida as principais abordagens para se interferir na via melanogênica antes, durante e depois da síntese da melanina. A despigmentação pode ser obtida regulando (I) a transcrição e atividade da tirosinase, proteína relacionada a tirosinase-1 (TRP-1), proteína relacionada a tirosinase-2 (TRP-2), e/ou peroxidase; (II) condução e distribuição dos melanossomos nos queratinócitos e (III) degradação da melanina e melanossomo e o retrocesso de queratinócitos pigmentados.

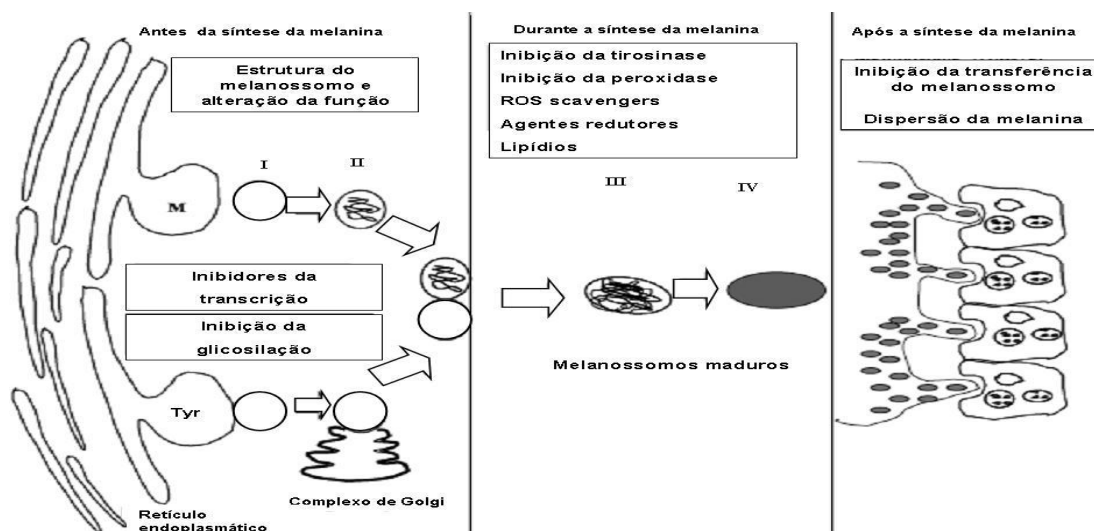


FIGURA 7 – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS POSSÍVEIS ABORDAGENS PARA INTERFERIR COM A VIA MELANOGENICA.

Tyr: TIROSINASE; M: MELANOSSOMOS; ROS: ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

FONTE: ADAPTADO DE BRIGANTI; CAMERA; PICARDO (2003)

Como resultado do papel chave desenvolvido pela tirosinase na biossíntese da melanina, a maior parte dos agentes clareadores atuam especificadamente para reduzir a função dessa enzima por vários mecanismos: (I) interferência com a transcrição e/ou glicosilação, (II) inibição por diferentes modalidades, (III) redução dos produtos e (IV) controle pós-transcrição (BRIGANTI; CAMERA; PICARDO, 2003).

O tratamento de distúrbios da hiperpigmentação pode ser um longo processo e o impacto psicossocial destas distúrbios deve ser levado em consideração (HALDER; RICHARDS, 2004). A duração do tratamento pode variar de indivíduo para indivíduo, sendo em geral alguns meses, evitando-se passar de dois anos (KATSAMBAS; STRATIGOS, 2001). Esse longo período é frequentemente insatisfatório (COTOLLESSA *et al.*, 2001). O sucesso do tratamento depende também da complacência do paciente ao aderir a todas as proposições e ao evitar possíveis problemas gerados pela exposição ao sol.

KATSAMBAS (2001) definiu uma série de parâmetros que são de grande relevância para a eficácia do tratamento, como por exemplo: antes do início do tratamento os pacientes devem ser informados de que ele tem a finalidade de melhorar a pigmentação em vez de resolver completamente a causa. Isto pelo fato de que os resultados podem não ser permanentes; a localização da disfunção também é um fator importante, uma vez que a histologia do mesmo pode levar a diferentes caminhos.

Atualmente, há três categorias de agentes de clareamento: compostos fenólicos, não fenólicos e fórmulas combinadas.

Dentro da classe dos compostos fenólicos o mais importante agente é a hidroquinona (HQ) – figura 8. É considerada o padrão ouro no tratamento das hiperpigmentações nos últimos 50 anos (HALDER; RICHARDS, 2004). Ela inibe a conversão de dopa em melanina inibindo a enzima tirosinase. Esta etapa se dá durante a síntese da melanina (BRIGANTI; CAMERA; PICARDO, 2003). A eficácia depende de vários fatores como a concentração, estabilidade química e o veículo usado. Em formulações de concentrações 4-5% são consideradas bem efetivas.

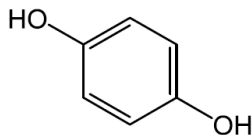


FIGURA 8 – ESTRUTURA DA HIDROQUINONA
FONTE: THE INDEX MERCK (1983)

O maior exemplo dos compostos não fenólicos é o ácido azelaico, que ocorre naturalmente como um composto saturado, dicarboxílico com nove carbonos (HALDER; RICHARDS, 2004). Pode oxidar ácidos graxos insaturados em ácidos dicarboxílicos, os quais competitivamente inibem a tirosinase (BRIGANTI; CAMERA; PICARDO, 2003; HALDER; RICHARDS, 2004).

Agentes de clareamento podem ser combinados com superficiais ou médio-profundos peels químicos, ácido glicólico ou peels de ácido tricloroacético 30%. Hidroquinona ou combinações da mesma, tretinoína e um corticosteróide tópico pode ser usado antes e/ou depois do peel para aumentar a resposta terapêutica e diminuir o risco de hiperpigmentação pós-inflamatória (KATSAMBAS; STRATIGOS, 2001). Ácido azelaico ou ácido kójico, agentes químicos de peeling, e lasers também tem sido muito utilizados (PANDYA; GUEVARA, 2000).

2.4.1 Ácido kójico

O ácido kójico (5-hidroxi-2-hidroximetil-4-pirona) – figura 9 - é um ácido orgânico (TAKAMIZAWA *et al.*, 1996) do metabolismo secundário dos fungos. É comumente produzido por cepas de *Aspergillus* (GOULD, 1938), *Acetobacter* e *Penicillium* (TAMURA *et al.*, 2006) em um processo aeróbio de uma ampla gama de fontes de carbono, pela conversão de glucose por meio de reações enzimáticas em várias etapas (MOHAMAD; ARIFF, 2007). Foi isolado pela primeira vez de uma cepa de *Aspergillus* em 1907 por Saito (GOMES *et al.*, 2001) e a estrutura do AK, que está representada na figura 9, foi definida por Yabuta em 1924 (ICHIMOTO; TATSUMI, 1964). O nome do ácido tem origem na palavra “koji” que significa “cultura”, pois ele foi extraído pela primeira vez de culturas de arroz.

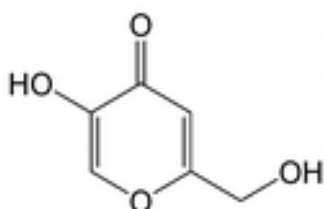


FIGURA 9 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO KÓJICO
FONTE: THE MERCK INDEX (1983)

Compostos heterocíclicos de seis membros contendo oxigênio constituem uma importante classe de produtos naturais biologicamente ativos e sintéticos, desempenhando um papel fundamental na química bioinorgânica (FARARD *et al.*, 2009). De acordo com BENTLEY (2006), a principal via biosintética é a conversão de glucose em AK, sem a quebra do anel piranosídico ou da cadeia carbônica (ARNSTEIN; BENTLEY, 1956), como pode ser visualizado na figura 10.

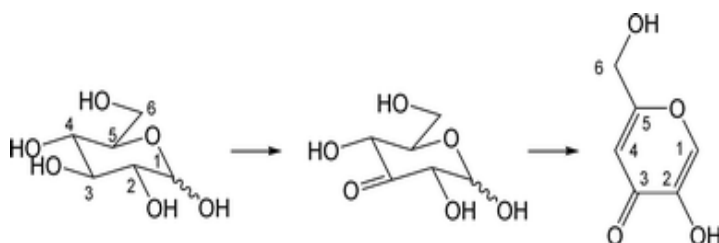


FIGURA 10 - POSSÍVEL BIOSÍNTESE DO ÁCIDO KÓJICO A PARTIR DA GLUCOSE
FONTE: BENTLEY (2006)

A reação inicial seria por uma oxidação como uma desidratação entre as estruturas II e III com a remoção de dois átomos de hidrogênio do carbono 3 da glucopiranosose sob influência de uma oxidase e transformando-se em 3-cetoglucose

fontes de carbono muito pobres para a produção de AK. *A.flavus* não sintetizou AK de L-lyxose ou L-ribose (ARNSTEIN; BENTLEY, 1956).

O AK tem fórmula molecular $C_6H_6O_4$ e peso molecular de 142,11 g/mol (BURDOCK; SONI; CARABIN, 2001). Esse ácido apresenta-se como um pó cristalino branco amarelado (THE MERCK INDEX, 1983). Ele cristaliza como agulhas prismáticas com acetona, etanol, éter ou metanol e acetato de etila. A faixa de fusão é 153–154°C e tem pKa próximo de 7,90 (THE MERCK INDEX, 1983) 7,88 (MCBRYDE; ATKINSON, 1961). Através de dados experimentais percebeu-se que à medida que a temperatura aumenta os valores de pKa diminuem (7.75, 7.68, 7.62 e 7.55) (SALLAM; HAGGAG; MASOUD, 1990).

O AK é altamente solúvel em água, metanol, acetona e moderadamente solúvel em éter, acetato de etila, clorofórmio e piridina (BURDOCK; SONI; CARABIN, 2001) (THE MERCK INDEX, 1983). Para mamíferos, a dose letal é de aproximadamente 1g/kg (BRTKO *et al.*, 2004). É conhecido por formar fortes quelatos com íons metálicos (BATTAINI *et al.*, 2000) como o cobre (NAITO *et al.*, 2007), ferro (MCBRYDE; ATKINSON, 1961) e compostos organometálicos (SYNYTSYA *et al.*, 2007). É usado analiticamente para detecção e quantificação de níveis muito baixos de ferro pela sua alta afinidade pelo metal (STENSON; CIOFFI, 2007).

Possui atividade bacteriostática leve (BRTKO *et al.*, 2004). Baseado nisto, ele tem sido usado como aditivo alimentício na prevenção do escurecimento enzimático (TAMURA *et al.*, 2006) como citado anteriormente. A prevenção do escurecimento enzimático pode ocorrer de forma direta pela mudança no cobre do sítio catalítico da enzima e indireta através de reações com intermediários, prevenindo uma adicional mudança da quinona em pigmentos escuros (FRIEDMAN, 1996). Ele é permitido como aditivo no Japão e é adicionado a alimentos como um antioxidante. Usado na produção de inúmeros alimentos incluindo *miso* (pasta de soja) *shoyu* (molho de soja) e *sake*. Também é utilizado na produção de fermentados como o *amazake*, *shouchu* (licor destilado) e *mirin* (tempero alcoólico) (BURDOCK; SONI; CARABIN, 2001). Intoxicação pelo consumo de alimentos contendo AK não tem sido reportadas (BRTKO *et al.*, 2004). Devido as suas propriedades bioquímicas, gêneros alimentícios que o contém são considerados como produtos mais seguros (EMAMI *et al.*, 2007). É relatado uma série de outros usos tais como precursor de potenciadores de sabor, antioxidante (TAKAMIZAWA *et al.*, 1996), efeitos

antinflamatórios (BRTKO *et al.*, 2004). Ele também é utilizado na saúde pública no tratamento de doenças. Como as relacionadas à sobrecarga de ferro como a β -talassemia (STENSON, 2007) em que o AK quelata os íons ferro que, neste tipo de doença, estão em excesso no organismo. Também no tratamento do diabetes no qual o AK quelata o vanádio e a estrutura resultante mimetiza a ação da insulina (DABROS, 2007).

AK é comumente usado na indústria de cosméticos devido às suas propriedades de absorção de radicais livres (MITANI *et al.*, 2001) e inibição da produção de melanina (ZBOROWSKI; GRYBOS; PRONIEWICZ, 2003). A atividade clareadora pode ser devido a uma lenta e reversível inibição competitiva da tirosinase (NOHYNEK *et al.*, 2004), durante a síntese da melanina (BRIGANTI; CAMERA; PICARDO, 2003), principalmente devido à atividade quelante do cobre (LIM, 2001), cofator essencial para a atividade da enzima. Devido ao seu conhecido mecanismo de inibição da tirosina é um componente essencial para a *downregulation* da hiperpigmentação da pele (AHN *et al.*, 2003). Os limites máximos de concentração de AK em cremes é 2% e hidroquinona acima de 5% podem causar efeitos colaterais severos como dermatite, eritema e hiperpigmentação (LIN; YANG; WU, 2007; YANG; ZHANG, 2007). O modelo de como poderia ser o complexo formado entre o AK e o cobre, que não permitiria a ativação das tirosinases, está representado na figura 13.

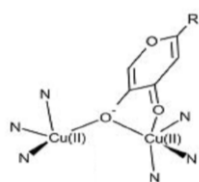


FIGURA 13 - MODELO DO COMPLEXO AK-COBRE
FONTE: TEPPER; BUBACCO; CANTERS (2002)

O mecanismo inibitório do AK sobre polifenol oxidase segue através das seguintes ações: interferindo com a captação de O_2 requerido para a reação enzimática; pela redução de compostos quinona para difenóis para prevenir a formação da melanina via polimerização e pela combinação das duas ações acima (CHEN; WEI; MARSHALL, 2001).

De acordo com KANG *et al* (2009) em células B16F10 de melanomas de camundongos o AK inibiu em 15,8% a produção de melanina a 200 $\mu\text{g/ml}$ e 31,1% a 400 $\mu\text{g/ml}$ e aproximadamente 80% de sobrevivência das mesmas células. LIM

(2001) em um estudo com mulheres chinesas que apresentavam melasma na face mostrou que houve uma melhora em 60,0% daquelas que usaram gel com AK (2%), hidroquinona (2%) e ácido glicólico (10%) enquanto que entre aquelas que usaram apenas hidroquinona (2%) e ácido glicólico (10%) a melhora ocorreu em 47,5%.

Melanócitos tratados com AK se tornam não dendríticos com uma diminuição da quantidade de melanina (BRTKO *et al.*, 2004). Comparativamente com a hidroquinona, que é prescrição de rotina, o AK tem a vantagem de ser farmacologicamente mais estável (BURDOCK; SONI; CARABIN, 2001). Tem-se encontrado também que o AK confere um impacto significativo na fisiologia de queratinócitos normais como uma supressão da síntese e secreção de citocinas (AHN *et al.*, 2003).

As radiações solares UVB (280-320 nm) e particularmente UVA (320-400 nm) têm a capacidade de gerar espécies químicas reativas como os radicais livres nas células. Esses têm se mostrado estar envolvidos em diversos efeitos biológicos na pele como o eritema, envelhecimento da pele etc (JUNG *et al.*, 2008). De acordo com os resultados obtidos por GOMES *et al* (2001) o AK tem uma atividade antioxidante eficiente contra três espécies reativas de oxigênio ($\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$ e $^1\text{O}_2$). Deste modo ele poderia ser utilizado em produtos cosméticos, bloqueando a ação e os efeitos colaterais de muitas espécies reativas de oxigênio produzidas.

2.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO KÓJICO

A concentração de uma amostra não é uma grandeza física observável e num processo analítico ela sempre é obtida de forma indireta, a partir de medidas de outras grandezas como absorção ou emissão de luz e condutividade (PIMENTEL; NETO, 1996). Deste modo é necessário que se disponha de métodos e aparelhos adequados para a identificação e quantificação do analito em harmonia com a sua real concentração. Uma das ferramentas mais importantes no controle de qualidade físico-químico é a utilização de equipamentos que envolvem a mensuração de um ou mais analitos de forma simultânea. A seleção e desenvolvimento de métodos de análises tem tradicionalmente sido assunto de importância para analistas que trabalham em laboratórios analíticos (WOOD, 1999). Cada aparelho tem seu princípio teórico básico e relacionando isto as técnicas são desenvolvidas, aperfeiçoadas e validadas.

As técnicas e os métodos de determinação e/ou quantificação de AK são bastante variadas, como por exemplo: cromatografia gasosa baseada em derivados silyl para separação e quantificação de AK (OWENS; WELTY; LUCAS, 1970); cromatografia em camada delgada (SCOTT; LAWRENCE; WALBEEK, 1970); determinação espectrofotométrica com sulfato de ferro (III) (KAWATE; KOIKE; FUKUO, 1972); cromatografia líquida de alta eficiência (QURESHI; PRENTICE; BURGER, 1979); determinação de AK em meio fermentativo pelo método “stopped flow” e espectrofotometria (TANIGAKI; OBATA; TOKUYAMA, 1980); cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (FRISVAD, 1987); cromatografia gasosa usando capilar de sílica fundida (GOTO; MATSUI; KITSUWA, 1990); coluna cromatográfica Bio Gel P-2 (KARITA *et al.*, 1991); método enzimático para a determinação de AK que apesar de ser muito sensível e específico pode ser mais oneroso que os demais métodos por causa da pureza das enzimas (STREFFER *et al.*, 1998); determinação do analito por HPLC-UV acoplado com fluorescência pela formação de um característico amarelo esverdeado brilhante (ZERINGUEJR *et al.*, 1999); Em 2004, GOMARA *et al.* desenvolveram e validaram um método de análise direta através de espectroscopia UV; CORRER *et al.* (2005) desenvolveram uma técnica para determinação de AK em produtos farmacêuticos utilizando-se de uma ferramenta analítica – calibração multivariada – e espectroscopia no UV; No ano seguinte duas novas técnicas foram publicadas com a mesma finalidade das outras anteriores. Em uma delas, YANG; ZHANG (2007) investigaram o comportamento voltimétrico do AK por PVP/ABPE e desenvolveram um método para quantificação. LIN; WU; HUANG,(2007) combinaram um HPLC com microdiálise online para determinação simultânea de ascorbil, AK e niacinamida em cosméticos clareadores. Já em 2007, (BUBACCO *et al.*, 2007) usaram absorção por raio-x; LIN; YANG; WU (2007) otimizaram um sistema para análise de AK, arbutin e hidroquinona simultaneamente através da eletroforese capilar eletrocínica micelar; SYNYTSYA *et al* (2007) complexaram AK com ferro III para quantificação em UV-Vis e conjugados com quitosana por RMN de H^1 ; método por LC/TOF-MS com confirmação dos dados também por UV e tempo de retenção no cromatógrafo líquido (SENYUVA; GILBERT; OZTURKOGLU, 2008).

Cada aparelho e técnica usada como HPLC, eletroforese capilar, UV-VIS e seus métodos tem recursos especiais e deficiências, os quais devem ser considerados (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998).

2.5.1 Espectroscopia eletrônica

A radiação numa faixa de comprimento de onda de 2-800 nm é passada através de uma solução do composto. Os elétrons das ligações são excitados e ocupam um estado quântico superior, absorvendo um pouco de energia que passa pela solução (WATSON, 1999). A absorção depende da estrutura eletrônica da molécula (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994) e do comprimento de onda da radiação (SOLOMONS, 1996). As transições dos elétrons podem ocorrer a partir de um entre vários estados de vibração e de rotação de um nível de energia eletrônica para um entre diversos estados de vibração ou de rotação do nível mais elevado (SOLOMONS, 1996). A transição de um elétron entre diferentes níveis energéticos é chamado de “transição eletrônica” e o processo de absorção é chamado “absorção eletrônica” (SKOOG *et al.*, 2000). O termo cromóforo é usado para descrever qualquer estrutura característica o qual leva a absorção na região do UV-Vis e inclui grupos nos quais as transições $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \sigma^*$ são possíveis (FURNISS *et al.*, 1989). A conjugação $n \rightarrow \pi$ leva a um deslocamento da absorção para comprimento de ondas maiores é chamado “efeito batocrômico” e inversamente para menores como “efeito hipsocrômico”. Quando há um aumento na intensidade o efeito é denominado “hipercrômico” e quando ela diminui é “hipocrômico” (HESSE; MEIER; ZEEH, 2008; FURNISS *et al.*, 1989). As regiões do espectro eletromagnético podem ser visualizados na figura 14 e, em especial, do ultravioleta e infravermelho no quadro 1.

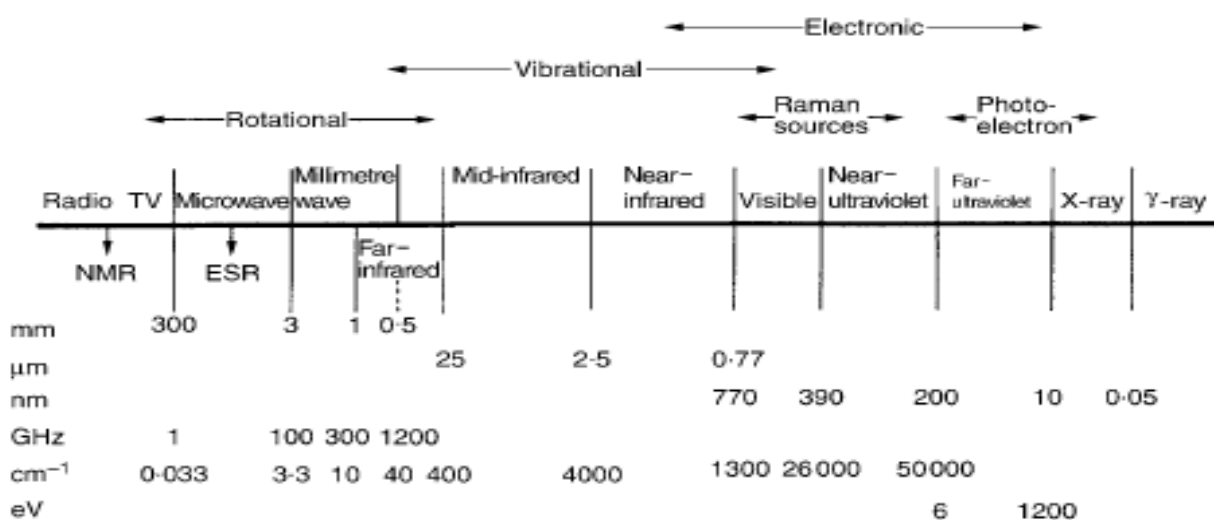


FIGURA 14 – REGIÕES DO ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO
FONTE: HOLLAS (2004)

REGIÃO ESPECTRAL	COMPRIMENTO DE ONDA	FREQÜÊNCIA EM NÚMERO DE ONDA (cm ⁻¹)
Ultravioleta	2 – 400 nm	5000000 - 50000
Ultravioleta visível	400 – 800 nm	50000 – 25000
Infravermelho	0,75 – 2,5 µm	13333 - 400
Infravermelho distante	2,5 µm – 1 mm	400 – 10

QUADRO 1 – REGIÕES DO ULTRAVIOLETA E INFRAVERMELHO DO ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO

FONTE: SKOOG *et al.*, 2000

Um dos grupos de maior interesse é o dos hidrocarbonetos insaturados, uma vez que eles apresentam hibridação sp^2 . Há uma ligação π dos elétrons p do carbono perpendiculares ao plano das ligações σ . Neste caso, os elétrons π ligantes têm uma força de ligação menor e podem passar para níveis de energia superiores, orbitais π antiligantes, sem se dar uma completa ruptura da molécula. Assim, verifica-se a absorção da radiação na região do ultravioleta, atribuído a transições dos elétrons π de orbitais ligantes para antiligantes transições (π - π^*). No estado π^* a ligação π não existe e a molécula só tem ligações simples para se manter como um todo. Estas transições correspondem a absorções na região de 200-700 nm (GONÇALVES, 1990).

Como ponto forte a espectroscopia no UV é fácil de usar, é relativamente barata e oferece uma boa precisão para mensurações quantitativas (WATSON, 1999). É uma das ferramentas mais poderosas e amplamente usada em análises quantitativas (SKOOG *et al.*, 2000). Como limitação, é moderadamente seletiva, dependendo do cromóforo, e não muito aplicável para misturas de analitos (WATSON, 1999). Entretanto, o mesmo ponto pode ser visto no âmbito de que grupos característicos podem ser reconhecidos em moléculas bastante complexas (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

Em 2004, GOMARA *et al* publicaram um artigo que teve por objetivo desenvolver e validar um método de quantificação por espectroscopia eletrônica direta e sem a complexação com alumínio do AK. Usando um meio aquoso, e comprimento de onda máximo de 269 nm, ela determinou para o método: intervalo, linearidade, robustez, exatidão e precisão. O método que foi desenvolvido é limitado apenas para a matéria-prima, sendo inviável para produto. Isso se dá uma vez que na região do comprimento de onda de quantificação do AK (269 nm) outras

moléculas que estão presentes nos cremes como conservantes (nipagin nipazol) contém cromóforos que absorvem na mesma região. Em 2007 (OLIVEIRA *et al.*, 2007) desenvolveram um método para quantificar AK em estudos de permeação *in vitro* com solução salina de cloreto de sódio 0,9% (m/v) no comprimento de onda 268 nm. Ácido kójico também pode ser determinado por colorimetria na reação com cloreto férrico em água (MORTON *et al.*, 1945) e de acordo com MOSS e MELLON (1941) em pH 5-6 na proporção de 1 ferro para 3 AK. Coloração vermelha escura é observada quando as soluções de ferro (III) e AK são misturadas na faixa de pH 2-3 (MURAKAMI, 1962b).

2.5.1.1 Complexometria

Compostos de coordenação incluem compostos com um átomo metálico ou íon e um ou mais ligantes (átomos, íons ou moléculas) que formalmente doam elétrons para o metal. Esses compostos também são conhecidos como Complexos (MIESSLER; TARR, 2003).

O estudo moderno dos compostos de coordenação se iniciou com Alfred Werner e Sophus Mads Jorgensen, sendo que pode-se concluir que Werner estava “certo” e Jorgensen estava “errado” na interpretação das evidências experimentais que eles tinham (HUHEEY; KEITER; KEITER, 1993). Werner foi capaz de explicar a natureza das ligações nos complexos e concluiu que nesses compostos o metal apresenta dois tipos de valência: primárias, que seria o número de cargas no íon complexo; e secundárias, que seria igual ao número de átomos ligantes coordenados ao metal (LEE, 1996).

Há três teorias que explicam as ligações entre metal e os ligantes nos complexos, todas formuladas na década de 30: teoria da ligação de valência, teoria do campo cristalino e teoria dos orbitais moleculares (LEE, 1996).

Baseado na estrutura do gás nobre é possível prever a estequiometria da maioria dos complexos de ligantes π -ácido. O número de elétrons de valência do átomo metálico adicionado ao número de pares de elétrons σ , contribuídos pelos ligantes, deve ser igual ao número de elétrons do átomo de gás nobre que sucede ao metal (COTTON; WILKINSON, 1978).

A determinação de constantes de estabilidade por titulações potenciométricas com alumínio é um método poderoso para definir a identidade e distribuição dos

complexos metal-ligante pela investigação da especiação em sistemas aquosos (JORDAN *et al.*, 1996).

Os elementos do grupo III formam complexos com muito maior facilidade do que os elementos do bloco s, pois apresentam menor tamanho e carga maior. Os compostos de alumínio apresentam como aspecto incomum as estruturas dimerizadas e parecem incluir ligações tricentradas envolvendo orbitais híbridos sp^3 no Al e C nas pontes Al-C-Al (LEE, 1980). Os elementos trivalentes formam complexos com a coordenação 4, 5 ou 6 catiônicos como o $[Al(H_2O)_6]^{3+}$, neutros ou aniônicos (COTTON; WILKINSON, 1978). A quelação com íons metálicos desempenha um papel central na homeostase da atividade enzimática, no qual mais de um terço de todas as enzimas conhecidas requerem a presença de íons metálicos da atividade catalítica (STENSON; CIOFFI, 2007). Conhecimento da especiação do Al^{3+} em soluções aquosas é importante para uma ampla gama de áreas de pesquisa como a de cosméticos (FOURNIER; SHAFRAN; PERRY, 2008). Em soluções aquosas, por exemplo, com citrato o alumínio é capaz de fazer seis ligações, entre moléculas de água e do próprio citrato ou apenas entre oxigênios do mesmo como pode ser visualizado na figura 15.

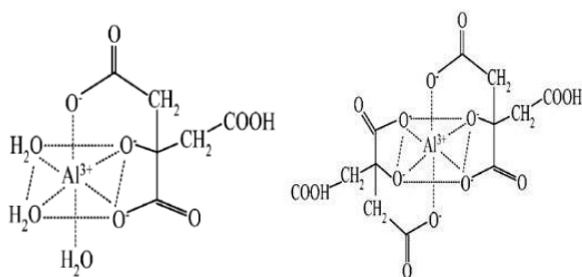


FIGURA 15 - ESTRUTURAS ESQUEMÁTICAS DA LIGAÇÃO DO ALUMÍNIO COM CITRATO
FONTE: ADAPTADO DE KUAN *et al.* (2005)

A molécula do cloreto de alumínio, em solução, devido à grande energia de hidratação liberada supera a elevada energia de ionização e os íons metálicos existem num estado hidratado. Estes apresentam seis moléculas de água firmemente ligadas formando uma estrutura octaédrica. Em solução ácida o potencial de redução de Al^{3+} até Al^0 é -1.66 e, em solução básica, é -2.31 (LEE, 1980). A estrutura do íon aluminato varia de acordo com o pH, de 8 a 12 os íons polimerizam através de pontes de OH e cada átomo de alumínio possui coordenação oito (COTTON; WILKINSON, 1978; LEE, 1980).

O interesse nos complexos metálicos com o ligante AK tem sido estimulado por fatores como: espera-se que os complexos possuam uma atividade antibiótica de amplo espectro e pela alta estabilidade dos complexos (BHATIA; KAUSHIK; SODHI, 1988).

2.5.2. Espectroscopia no infravermelho

A radiação infravermelha não tem energia suficiente para provocar excitações dos elétrons, mas faz com que os átomos, ou grupo de átomos, dos compostos orgânicos vibrem com maior rapidez e com maior amplitude em torno das ligações covalentes que os unem. Estas vibrações são quantizadas e, quando ocorrem, os compostos absorvem energia IV em certas regiões do espectro (SOLOMONS, 1996). Apesar da energia não ser suficiente a radiação pode induzir transições em estados vibracionais e rotacionais associados com o estado eletrônico fundamental das moléculas (SKOOG *et al.*, 2000). A intensidade das bandas de absorção depende da magnitude da carga na oscilação do momento dipolo da ligação durante a transição e também é diretamente proporcional ao número de ligações para aquela absorção particular. (FURNISS *et al.*, 1989).

O IV está inserido no espectro eletromagnético entre as regiões do visível e das microondas e pode ser dividida em infravermelho próximo ($14290\text{ cm}^{-1} - 4000\text{ cm}^{-1}$), médio ($4000\text{ cm}^{-1} - 700\text{ cm}^{-1}$) e infravermelho distante ($700\text{ cm}^{-1} - 200\text{ cm}^{-1}$) (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979). A região mais importante para a química orgânica é compreendida entre 4000 e 660 cm^{-1} (FURNISS *et al.*, 1989).

Na região do infravermelho, a absorção da radiação pode dar informações sobre a identidade dos compostos na presença ou ausência de grupos funcionais e estrutura das moléculas. Com exceção de moléculas diatômicas homonucleares, todas as outras absorvem radiação infravermelha. Por isso, é um dos métodos espectroscópicos de mais ampla aplicação (SKOOG *et al.*, 2000). É adequado para usos em linha, próxima de uma aplicação universal, pois qualquer molécula contém ligações C-H, N-H, S-H ou O-H (PASQUINI, 2003). Há dois tipos principais de vibrações moleculares: estiramento axial e deformação angular. Os estiramentos axiais podem ser simétricos ou assimétricos. Deformações angulares podem ser simétricas no plano (tesoura), assimétrica no plano (balança), simétrica fora do plano (torção) e assimétrica fora do plano (abano) (FURNISS *et al.*, 1989).

O principal uso do infravermelho para moléculas como complexos metálicos é fornecer um método rápido para determinação da formação do complexo. Em alguns casos, informações estruturais específicas podem ser obtidas (JORDAN *et al.*, 1996). A técnica tem sido amplamente utilizada como um meio direto e rápido para identificar produtos pela indústria farmacêutica (PASQUINI, 2003).

Uma interpretação completa de um espectro é, muitas vezes, difícil e complexa, pois a maioria dos compostos orgânicos tem um número muito grande de movimentos de flexão e alongamento. Entretanto não há a necessidade da elucidação completa do espectro, mas da identificação mínima de grupos funcionais. Se por um lado essa complexidade é um ponto negativo, ela também tem um ponto positivo quando dois espectros são quase que perfeitamente superponíveis a chance de elas terem sido geradas por amostras de uma mesma substância é muito grande.

O método experimental mais utilizado para analisar carbonila e complexos metálicos é espectroscopia no infravermelho. A utilidade da frequência de estiramento da carbonila se dá pela sensibilidade desta absorção em relação à população de elétrons dos orbitais CO antiligantes (HUHEEY; KEITER; KEITER, 1993).

Infravermelho pode ser útil em dois aspectos: o número de bandas de IV depende da simetria molecular e a determinando se é capaz de decidir ou reduzir o número de possibilidades entre as alternativas geométricas; a posição das bandas de IV podem indicar a função do ligante e pode descrever o meio em que está o elétron do metal (MIESSLER; TARR, 2003). Tem sido amplamente usada em análises qualitativas e quantitativas, sendo importante para a avaliação de matérias-primas e produtos (STUART, 2004). É uma técnica analítica que pode ser quantitativa, rápida, não destrutiva e praticamente não exige a utilização de reagentes e solventes.

2.5.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Sob condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de rádio-frequência em frequências definidas pelas características do analito (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Os núcleos de certos elementos e isótopos comportam-se como se fossem

ímãs girando em torno de um eixo. Quando se coloca um composto contendo átomos de ^1H ou de ^{13}C num campo magnético muito forte e simultaneamente se irradia o composto com energia eletromagnética, os núcleos podem absorver energia que é quantizada (SOLOMONS, 1996). A nuvem eletrônica que circunda o núcleo também tem carga, movimento e, portanto, momento magnético. O campo magnético gerado pelos elétrons altera o campo magnético no microambiente ao redor do núcleo (LAMBERT; MAZZOLA, 2003). A absorção é função de determinados núcleos da molécula. Por convenção, frequência e, portanto, a força do campo magnético aumenta da esquerda para direita. Movimentos da esquerda para direita são denominados para campo alto (mais blindadas) e da direita para esquerda de movimentos para campo baixo (desblindadas) (FURNISS *et al.*, 1989). Um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades constitui-se em um espectro de RMN (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979).

A técnica é somente aplicável aos núcleos que possuem número de quantum spin (I) maior que zero (FURNISS *et al.*, 1989). Ressonância magnética nuclear é um método poderoso para se estudar complexos com Al^{3+} em solução. Além disso, espectros com ^1H e ^{13}C podem ser obtidos de um modo relativamente simples (JORDAN *et al.*, 1996). Uma evolução importante na detecção de sinais fracos é a RMN com Transformada de Fourier (FT) (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979). RMN é uma ferramenta valiosa na caracterização de complexos organometálicos (MIESSLER; TARR, 2003).

2.5.4 Titulação potenciométrica

Potenciometria é uma técnica comum para determinar as constantes de estabilidade por causa da simplicidade dos aparatos experimentais e a facilidade com o qual o sistema pode ser automatizado (JORDAN *et al.*, 1996).

Embora os resultados da titulação potenciométrica não possam fornecer uma compreensão da estrutura do complexo, verificando as constantes de ligação as quais mostram a força de interação entre um ligante e um íon metálico, um pode inferir qual o sítio básico é mais provável para interagir com o ácido de Lewis; a especiação de acordo com a carga nos valores de pH podem ser calculados (MERCÊ *et al.*, 2002). O mecanismo dominante para a reação de primeira hidrólise do Al^{3+} é uma troca rápida e direta de H^+ entre adjacentes $\text{H}_2\text{O} / \text{H}^+$ e $\text{H}_2\text{O} / \text{OH}^-$; pó

segundo e terceiro passos da hidrólise são também rápidos, porque o mecanismo de troca do H^+ deveria acontecer nessas reações também. Deste modo, sob a maioria das condições as espécies Al^{3+} , $Al(OH)^{2+}$ e $Al(OH)_2^+$ se interconvertem rapidamente e estão em equilíbrio dinâmico entre eles (FAUST *et al.*, 1995). O pH de uma solução de um ácido poliprótico submetida a uma titulação pode ser estimado em qualquer ponto considerando as espécies primárias em solução e o equilíbrio de transferência de próton que determina o pH (ATKINS; JONES, 2001). Um melhor entendimento da bioquímica do alumínio requer um aumento do conhecimento do equilíbrio do complexo do íon Al^{3+} com ligantes. Para isto é absolutamente necessário construir modelos de especiação (VENTURINI-SORIANO; BERTHON, 1998).

2.6 VALIDAÇÃO

Atualmente não há uma gama muito ampla de técnicas simples de quantificação de AK em preparações farmacêuticas. Sendo assim faz-se necessário o estudo e a conseqüente validação de mais métodos que quantifiquem esse analito.

Em indústrias, tais como a farmacêutica, química e alimentícia, os métodos analíticos são os “olhos” e os “ouvidos” para todos os materiais produzidos e usados (BOULANGER *et al.*, 2007). A escolha de uma metodologia analítica adequada é de fundamental importância para o procedimento do controle de qualidade de uma substância ativa ou forma farmacêutica (VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007).

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de método conhecido, envolve processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório (BRITO *et al.*, 2003). Esse processo denomina-se validação.

A validação confere ao processo maior confiabilidade e aceitação dos resultados. É feita para assegurar que a metodologia analítica seja exata, específica, reprodutível e robusta sobre um intervalo especificado em que o analito será analisado (SHABIR, 2003). É uma parte inevitável no desenvolvimento de métodos farmacopeicos ou procedimentos analíticos de controle de qualidade (GRDINIC; VUKOVIC, 2004). A ANVISA (2003) preconiza que o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi ou quantitativa. Através do fornecimento de evidência objetiva, comprova que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (INMETRO, 2003). O processo visa dar aos

laboratórios e aos órgãos regulatórios uma garantia que cada mensuração que será feita posteriormente será “próxima o suficiente” ao “valor verdadeiro” ou no mínimo que a diferença estará abaixo do limite aceitável (HUBERT *et al.*, 2004). Validar um resultado é fazer com que todos os procedimentos até chegar ao resultado final sejam aceitos como corretos.

A validação de um método analítico não significa que este possa ser aplicado sem restrições para diferentes medicamentos com o mesmo princípio ativo, uma vez que os resultados são influenciados por inúmeros fatores como a estrutura química, diferenças entre as fórmulas de um laboratório para outro (VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007).

Usar testes estatísticos adequados para cada parâmetro faz com que as tomadas de decisão sejam menos subjetivas e, conseqüentemente, deixa o método mais fácil de ser explicado e de ser implementado. O INMETRO (2003) sugere uma série de elementos e pontos chave que podem ser relevantes durante o processo de desenvolvimento analítico. O planejamento e execução da validação pode ser feito com a seguinte seqüência: Definir a aplicação, objetivo e escopo do método; Definir os parâmetros de desempenho e critérios de aceitação; Desenvolver um procedimento operacional para validação; Definir os experimentos de validação; Verificar se as características de desempenho do equipamento estão compatíveis com o exigido pelo método em estudo; Qualificar os materiais, por exemplo, padrões e reagentes; Executar os experimentos preliminares de validação; Ajustar os parâmetros do método e/ou critérios de aceitação, se necessário; Executar experimentos completos de validação; Preparar um procedimento operacional para execução do método, na rotina; Definir critérios de revalidação (por exemplo, mudanças de pessoal, condições ambientais, equipamentos, periodicidade), e definir tipo e freqüência de verificações de controle da qualidade analítica para a rotina.

Os processos de validação são dinâmicos e nesse contexto têm-se as etapas do ciclo (que aparecem dentro dos retângulos) e as ferramentas principais ou técnicas (que estão nas elipses) da figura 16 (FEINBERG, 2007).

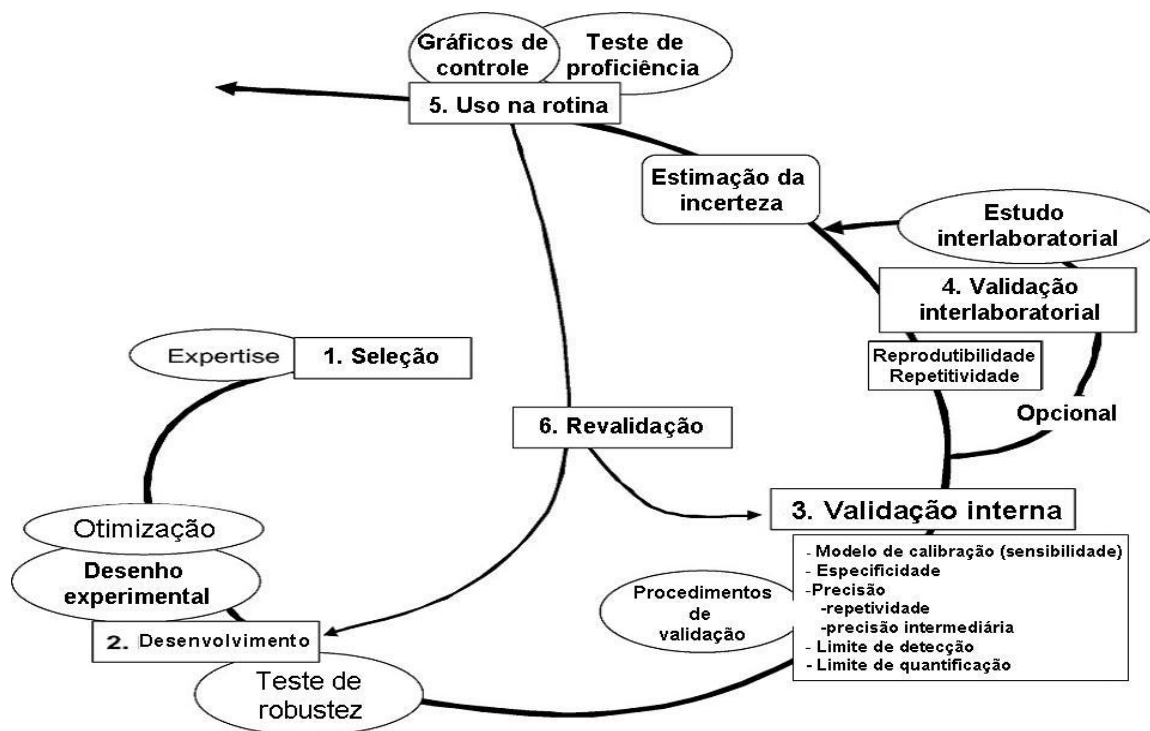


FIGURA 16 - CICLO DE VIDA DE UM MÉTODO DE ANÁLISE
 FONTE: ADAPTADO DE FEINBERG (2007)

Os métodos analíticos podem ser classificados de acordo com a finalidade como está descrito no Quadro 2:

CATEGORIA	FINALIDADE DO TESTE
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

QUADRO 2 – CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS DE ACORDO COM A FINALIDADE
 FONTE: ANVISA (2003)

Os parâmetros a serem analisados em um método a ser validado são: especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade (limite de detecção), limite de quantificação, exatidão e robustez. Cada categoria descrita no quadro 2 exige um determinado conjunto de testes, conforme relacionados no Quadro 3:

PARÂMETRO	CATEGORIA I	CATEGORIA II QUANTITATIVO ENSAIO LIMITE		CATEGORIA III	CATEGORIA IV
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Repetibilidade Precisão Intermediária	Sim	Sim	Não	Sim	Não
	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a Precisão Intermediária.

QUADRO 3 – ENSAIOS NECESSÁRIOS PARA A VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS DE ACORDO COM A SUA FINALIDADE

FONTE: ANVISA (2003)

Como a proposta do método desse trabalho é quantificar princípio ativo em produtos farmacêuticos e matéria-prima, os parâmetros analisados foram: intervalo, linearidade, precisão, seletividade, exatidão e robustez.

2.6.1 Seletividade / especificidade

A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção (INMETRO, 2003). A seletividade é a capacidade que um método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003).

Para métodos cromatográficos, serão específicos aquele que mensurarem com exatidão o analito na presença de todos os outros componentes potenciais da amostra (SHABIR, 2003). Mensurações espectrométricas como UV-VIS tendem a serem seletivas, pois não distinguem muito bem compostos que tenham cromóforos semelhantes (PERSSON; VESSMAN, 1998).

Seletividade tem sua origem em “seligo”, que em latim significa escolher ou selecionar. Seletivo é algo que “tende a escolha com cuidado” e seletividade o “estado ou qualidade de ser escolhido” (PERSSON; VESSMAN, 2001). A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de

interesse (PHARMACOPEIA, 1999). Em procedimentos analíticos os métodos para detectar qualitativamente são seletivos e os que mensurarem quantitativamente serão específicos (VESSMAN, 1996), porém poucos métodos são realmente específicos (PERSSON; VESSMAN, 1998). Entretanto os termos tem sido usados indistintamente ou com diferentes interpretações (INMETRO, 2003) e para o termo especificidade o mesmo significado de seletividade tem sido freqüentemente utilizado (RIBANI *et al.*, 2004), embora no senso restrito não seja correto (PETERS; DRUMMER; MUSSHOF, 2006) por terem significados diferentes (ROZET *et al.*, 2007). Esse problema poderia ser evitado caso se utilizasse apenas o termo seletividade -como sugere a IUPAC- uma vez que são diminutos os métodos que respondem à apenas uma substância.

2.6.2 Linearidade e intervalo

A linearidade de um procedimento analítico é a habilidade para obter resultados dos testes os quais são diretamente proporcionais à concentração (valor) do analito na amostra dentro de um intervalo especificado (ICH, 2005; INMETRO, 2003; ANVISA, 2003). Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004). Ela se aplica aos resultados (concentração) e não às respostas (sinal) (HUBERT; NGUYEN-HUU; BOULANGER; CHAPUZET; COHEN *et al.*, 2007). Deve ser avaliado entre a faixa do procedimento analítico. Pode ser demonstrado diretamente na substância (pela diluição de uma solução padrão estoque) e/ou pesagens separadas de misturas sintéticas dos componentes do produto, usando o procedimento proposto (ICH, 2005)

Deve ser avaliada pela inspeção visual do contexto de sinais como uma função da concentração do analito. Se há uma relação linear, ela deverá ser investigada por métodos estatísticos apropriados, por exemplo, pelo cálculo de uma regressão linear (ICH, 2005). Para estabelecer a linearidade, um mínimo de 5 concentrações é recomendada (ICH, 2005). A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b$$

y = resposta medida (absorbância); x = concentração;

a = inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y, quando x=0.

O coeficiente de correlação linear (r) é freqüentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático. Um valor maior que 0,90 é, usualmente, requerido. Quanto mais se aproximar de 1,0 o coeficiente menor será a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al.*, 2004). O método pode ser considerado como livre de tendências (*unbiased*) se o corredor de confiança da reta de regressão linear contiver a origem (INMETRO, 2003). O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99 (ANVISA, 2003).

Intervalo é a faixa entre a maior e a menor concentração (valor) do analito na amostra para o qual tem sido demonstrado que o procedimento analítico tem um nível adequado de precisão, exatidão e linearidade (ICH, 2005; SHABIR, 2003). É normalmente derivado dos estudos de linearidade. É estabelecido pela confirmação de que o procedimento analítico proporciona um grau de aceitabilidade da linearidade, exatidão e precisão dentro dos extremos da faixa especificada. Geralmente vai de 80 a 120% da concentração teste (ICH, 2005; ANVISA, 2003).

2.6.3 Exatidão

Expressa a proximidade da concordância entre o valor no qual cada um é aceito como um valor convencional verdadeiro ou um valor referencia aceito e o valor encontrado (SHABIR, 2003; HUBERT; NGUYEN-HUU; BOULANGER; CHAPUZET; CHIAP *et al.*, 2007). É chamada, às vezes, de veracidade (ICH, 2005).

Pode ser feita pela comparação dos resultados do procedimento analítico com aqueles de um segundo procedimento bem caracterizado (ICH, 2005; ANVISA, 2003). A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

FIGURA 17 – Fórmula da exatidão

Quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (tendência) (INMETRO, 2003).

Na avaliação da exatidão utilizando um material de referência pode-se usar testes estatísticos como o erro relativo, teste de hipóteses, entre outros. Caso não seja alcançado resultados satisfatórios deve ser feita uma investigação para averiguar as possíveis causas, reavaliar o ensaio e efetuar ações corretivas.

2.6.4 Precisão

A precisão de um procedimento analítico expressa a proximidade de concordância (grau de dispersão) entre a série de leituras obtidas de múltiplas amostras da mesma amostra homogênea sob condições prescritas (ICH, 2005)(INMETRO, 2003). É a parte mais importante de qualquer validação de método analítico (WALFISH, 2006).

Deve ser investigada usando amostras autênticas e homogêneas. Entretanto, se não é possível obter uma amostra homogênea, ela deve ser investigada usando amostras preparadas artificialmente ou uma amostra solução (ICH, 2005).

A precisão pode ser considerada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (ICH, 2005). Repetitividade e reprodutibilidade são geralmente dependentes da concentração do analito e devem ser determinadas para um número diferente de concentrações. Neste caso o desvio padrão relativo pode ser útil, uma vez que foi normalizado com base na concentração e deste modo ele é praticamente constante ao longo da faixa de interesse (INMETRO, 2003).

2.6.4.1 Repetitividade

É o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade: mesmo procedimento de medição; mesmo observador; mesmo instrumento usado sob mesmas condições; mesmo local, e repetições em curto espaço de tempo (INMETRO, 2003).

Deve ser realizada com um mínimo de 9 determinações cobrindo a faixa especificada (80,100 e 120%) para o procedimento ou 6 determinações da

concentração teste (100%) (INMETRO, 2003; ANVISA, 2003). O termo repetitividade é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia (INMETRO, 2000). Por outro lado, a ANVISA (2003) utiliza o mesmo conceito para o termo repetibilidade.

2.6.4.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas; diferentes equipamentos; diferentes tempos.

O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados.

Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório e mais aconselhável de usar. Para determinar a precisão intermediária de um método, efetuam-se “n” medições em replicata, ou em ensaio único, sobre a amostra, nas condições pré-definidas, pois existem vários métodos de estudar este tipo de precisão. (INMETRO, 2003).

2.6.4.3 Reprodutibilidade

Concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes. Refere-se aos resultados de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopéias (ANVISA, 2003; ICH, 2005). A ICH e a ANVISA sugere um mínimo de nove determinações de um mínimo de três níveis de concentrações, de acordo com o intervalo especificado, ou um mínimo de seis determinações para uma única concentração teste. A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula:

$$\text{DPR} = \frac{(\text{DP} \times 100)}{\text{CMD}}$$

FIGURA 18 – FÓRMULA DO DESVIO PADRÃO RELATIVO

Em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo da matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (ANVISA, 2003).

2.6.5 Robustez

É uma medida da capacidade dos resultados continuarem inalterados, por pouco, frente a variações deliberadas nos parâmetros do método e proporciona uma indicação da confiabilidade durante usos normais (ICH, 2005). Ela é descrita como a estabilidade do método (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998).

Mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado (INMETRO, 2003).

2.6.6 Sensibilidade

A sensibilidade é definida como a capacidade de um método em distinguir, com determinado nível de segurança, duas concentrações próximas (ICH, 2005).

A sensibilidade foi verificada através dos limites de detecção e quantificação. O limite de detecção (LD) de um procedimento analítico é a menor quantidade do analito numa amostra a qual pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato (FDA, 1995), sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003). Ele é calculado pelo desvio padrão do intercepto com o eixo Y (a partir de três curvas analíticas) multiplicado por três e dividido pela inclinação da curva analítica.

O limite de quantificação (LQ) de um procedimento analítico individual é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser determinado com adequada precisão e exatidão (FDA, 1995). Ele é calculado pelo desvio padrão do intercepto com o eixo Y (a partir de três curvas analíticas) multiplicado por dez e dividido pela inclinação da curva analítica.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método para a quantificação de ácido kójico matéria-prima e produto por espectrofotometria no ultravioleta.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método para a quantificação do ácido kójico em matéria-prima e em cremes, por espectrofotometria no ultravioleta, tendo por base as propriedades quelantes do analito com íons metálicos (Alumínio);
- Validar o método desenvolvido segundo normas nacionais e internacionais;
- Testar o método desenvolvido em preparações magistrais contendo o ácido kójico em associação com a hidroquinona;
- Quantificar ácido kójico e a hidroquinona na mesma análise;
- Elucidar o tipo de complexo formado entre o ácido kójico e o alumínio

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

A pesquisa foi dividida basicamente em duas etapas. A primeira etapa compreendeu o desenvolvimento e validação de um método espectrofotométrico (UV) para a quantificação de ácido kójico em matéria-prima e em creme cosmético. No desenvolvimento foram testados diferentes solventes para definir o mais adequado, o comprimento de onda, a absorvidade molar, bem como a necessidade de otimização do método. A validação foi realizada baseada na Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, farmacopéia americana (USP, 2005) e da Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 2005) nos parâmetros: linearidade, sensibilidade, repetitividade, precisão intermediária, exatidão e robustez. Na segunda etapa procurou-se elucidar o tipo de complexo formado entre AK e AlCl_3 . Para essas análises foram utilizadas algumas ferramentas como a espectrometria no UV-Vis, titulação potenciométrica, infravermelho e ressonância magnética nuclear.

4.2 MATERIAL

4.2.1 Materiais e reagentes

- ácido kójico padrão Sigma Aldrich Chem. Co. (98,0%)
- ácido kójico matéria-prima Via Farma (100.5%)
- álcool metílico P.A. (FMAIA)
- água ultrapura e deuterada
- brometo de potássio (KBr) P.A.
- cloreto de alumínio solução 0,2% (LABSYNTH) e padrão 1000mg/l (MERCK)
- cloreto de sódio (NaCl) P.A.
- cloreto de potássio P.A.
- creme Lanette (DAGFARMA)
 - chemynol (0,3 %), imidazoli (0,6 %), propilenoglicol (0,5 %), lanette N (16,0 %), vaselina líquida (5,0%), BHT cristal (0,05 %), nipazol (0,1 %), glicerina branca bidestilada (5,0 %), EDTA (0,1%), nipagin (0,2%), silicone volátil (2,0 %) e água purificada qsp.

- creme Lanette AK 2% (DAGFARMA), AK 2% e HQ 4 % (DAGFARMA)
- creme não iônico (DAGFARMA)
 - chemynol (0,3 %), silicone dc 9040 (1,0 %), imidazoli (0,6 %), propilenoglicol (0,5 %), chembase NF (18,0 %), BHT cristal (0,1 %), nipazol (0,05 %), glicerina branca bidestilada (5,0 %), EDTA (0,2%), nipagin (0,15%), silicone volátil (1,0 %) e água purificada qsp.
- creme não iônico AK 2% (DAGFARMA), AK 2% e HQ 4 % (DAGFARMA)
- cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm
- papel filtro quantitativo (FRAMEX®; J.PROLAB)

4.2.2 Equipamentos

- aparelho de ponto de fusão (BUCHI SMP-20)
- balança analítica (METTLER TOLEDO EXCELENCE PLUS)
- espectrofotômetro UV-Vis (AGILENT 8453E) – Equipamento 1
- espectrofotômetro UV-Vis (SHIMADZU 1601PC) – Equipamento 2
- aparelho de ressonância magnética nuclear (BRUKER Avance DRX 400)
- espectrômetro infravermelho (BOMEM MB 100)
- espectrômetro de absorção atômica AA-220 FS Varian
- potenciômetro digital (HANNA HI 4521)
- titulador automático Titrando 805E (METROHM)

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Desenvolvimento do método

O ácido kójico é um fármaco que apresenta um cromóforo característico e possui intensa absorção na região do ultravioleta. Deste modo torna-se viável o desenvolvimento de um método por espectrofotometria nessa região para a quantificação do mesmo. Inicialmente foram testados os solventes água e metanol e diferentes valores de pH, verificada a necessidade de filtração principalmente para o produto e o processo mais adequado, verificação de outras substâncias presentes na formulação e que também podem absorver na mesma região do espectro, como

melhorar a seletividade, seleção do melhor comprimento de onda e validação do método.

4.3.1.1 Escolha do solvente e influência do pH

Para este ensaio foram preparadas soluções-mãe de ácido kójico, a primeira em água (1500 µg/mL) e a segunda em metanol (1500 µg/mL). A partir da solução-mãe aquosa de ácido kójico foram preparadas três soluções. A primeira contendo AK 15 µg/mL; a segunda AK 15 µg/mL em meio acidificado (HCL 0,1M); a terceira AK 15 µg/mL em meio alcalinizado (NaOH 0,1M). Procedeu-se da mesma forma para a solução metanólica. Dessas soluções foram obtidos os espectros de absorção na região de 200-400 nm foram obtidos em espectrofotômetro UV-Vis Agilent 8453E, com cubeta de quartzo, espessura de 1,0 cm, à temperatura de 20°C.

4.3.1.2 Avaliação da seletividade

O método foi desenvolvido com o propósito de ser utilizado para quantificar ácido kójico em cremes cosméticos. Estes cremes geralmente contêm conservantes, sendo também comuns a associação do AK com a hidroquinona. Desta forma, a possível interferência destes componentes foi avaliada.

Para avaliar a interferência destes componentes foram preparadas soluções aquosa e metanólica dos componentes da formulação (nipagin®, nipazol®, hidroquinona e da base que era creme não iônico ou Lanette obtidas comercialmente). Para o nipagin e nipazol a concentração final foi de 10 µg/ml. Para a hidroquinona a concentração final foi de 20 µg/ml e para a base 1 mg/mL. Para os conservantes também foram preparadas soluções ácidas e básicas.

Para melhorar a seletividade de métodos espectrofotométricos, em geral, deve-se deslocar a banda de absorção do analito de interesse para comprimentos de onda de maiores valores, onde poucas moléculas absorvem. Tomando por base as características quelantes do analito, uma possibilidade foi a de utilização de um cátion metálico trivalente (Al^{3+}), tendo em vista que os complexos em geral promovem um deslocamento batocrômico. Para a formação do complexo uma solução ácida (HCl 0,1M) de cloreto de alumínio 0,2% (p/V) foi adicionada, em

excesso na proporção molar, à solução de AK (20 µg/ml) tanto em meio aquoso quanto metanólico.

Para a seleção do comprimento foram preparadas soluções de ácido kójico na concentração de 15 µg/ml, em solução aquosa, metanólica e com solução ácida de cloreto de alumínio, e os espectros das soluções foram obtidos na região de 200 – 400 nm. A seleção do melhor comprimento de onda foram feitas levando-se em consideração a intensidade da absorção e a região do espectro mais seletiva dentre as bandas de absorção.

Outro recurso utilizado foi avaliação do coeficiente de correlação. Para esta análise foram preparadas várias soluções de AK em solução ácida de cloreto de alumínio em concentrações variando de 0,1 a 50 µg/ml. Em seguida foram obtidos os espectros das soluções na região de 200 – 400 nm. A partir do conjunto de espectros foram obtidas as curvas analíticas para os vários comprimentos de onda do espectro (200 – 400 nm) e calculados os coeficientes de determinação. Os valores de coeficiente de determinação foram representados graficamente versus comprimento de onda, para avaliar a região de melhor proporcionalidade.

4.3.1.3 Influência da proporção AK e AlCl_3 na intensidade de absorção

Para esta análise foram preparadas soluções de ácido kójico (15 µg/ml) e solução ácida (HCl 0,1M) de cloreto de alumínio 0,2% p/v. Em seguida foram misturadas de tal forma que a concentração de AK foi mantida fixa em 15 µg/ml, e a concentração da solução ácida de cloreto de alumínio variou, de tal forma a se obter 28 soluções em que o AK e o AlCl_3 encontravam-se em proporções molares (mol de AK / mol de AlCl_3) de 1:0 até 1: 136 (tabela 1).

4.4 VALIDAÇÃO

O método espectrométrico envolvendo a complexação do AK com cloreto de alumínio em meio metanólico uma vez desenvolvido foi validado tomando por base os parâmetros preconizados pela farmacopéia americana (USP, 2005), RDC 899 (ANVISA, 2003) e da Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 2005).

4.4.1 Linearidade e intervalo

Para a determinação da linearidade foi preparada uma solução-mãe com concentração de 2000 µg/ml e a partir desta foram feitas diluições em balões volumétricos de 10 mL para se obter soluções de concentrações que variaram de 1-100 µg/mL (1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg/mL). Em cada sistema foi adicionado 1,5 mL de solução ácida (HCl 0,1M) de cloreto de alumínio 0,2% (p/V) e o volume completado para 10 ml com metanol. As absorvâncias foram determinadas em $\lambda = 305$ nm. O ensaio foi realizado em triplicata. Os gráficos foram traçados correlacionando-se as concentrações às respectivas absorvâncias. Foram determinados a equação da reta e o coeficiente de determinação. A partir do gráfico da linearidade foi também definido o intervalo, e a concentração de trabalho.

O intervalo foi definido a partir do ensaio da linearidade, e considerando a concentração de trabalho, $\pm 20,0\%$ da concentração teórica teste recomendada para determinação quantitativa de matéria-prima e produto acabado. Para a construção da curva padrão foram realizadas três pesagens para preparar três soluções padrão de 2000 µg/mL. A partir destas soluções foram preparadas soluções de diferentes concentrações de AK (5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL) e adição de 1,5 mL de solução ácida (HCl 0,1 M) de cloreto de alumínio 0,2% (p/V), sendo o volume completado para 10 mL com metanol. As leituras de absorvância foram realizadas $\lambda = 305$ nm, em triplicata, com um total de nove mensurações, calculado o DPR%, determinada a equação de reta e o coeficiente de correlação. Procedeu-se o ensaio de linearidade utilizando a mesma metodologia com a recuperação de AK na presença ou ausência de hidroquinona em creme Lanette, na faixa de 5-30 µg/mL.

Para a avaliação da linearidade procedeu-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade, a comparação de variâncias através do cálculo da razão entre as médias quadráticas da regressão e médias quadráticas dos resíduos com comparação com o valor da distribuição F tabelado para um grau de confiança de 95% com 1 e 8 graus de liberdade.

4.4.2 Sensibilidade

A sensibilidade foi avaliada através dos limites de detecção e quantificação. O limite de detecção foi calculado pelo desvio padrão do intercepto com o eixo Y (a partir de três curvas analíticas) multiplicado por três e dividido pela inclinação da curva analítica. O limite de quantificação foi calculado pelo desvio padrão do intercepto com o eixo Y (a partir de três curvas analíticas) multiplicado por dez e dividido pela inclinação da curva analítica.

4.4.3 Precisão

A precisão foi obtida através da avaliação da proximidade dos resultados obtidos a partir de uma série de mensurações de uma mesma amostra. Ela é avaliada estatisticamente pelo cálculo do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação e erro relativo. Ela foi mensurada através da análise dos parâmetros repetitividade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dias).

4.4.3.1 Repetitividade

A repetitividade foi avaliada em três níveis de concentração ($n = 18$). Foram preparadas três soluções-mãe de concentrações iguais a 2000 $\mu\text{g/mL}$ e partir destas foram feitas diluições para se obter soluções de ácido kójico de diferentes concentrações (10, 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$). Em cada sistema foi adicionado 1,5 mL de solução ácida (HCl 0,1 M) de cloreto de alumínio 0,2% (p/V), e o volume completado para 10 mL com metanol. As leituras das absorbâncias foram feitas a 305 nm e calculado o DPR. Para cada concentração também foi calculado o erro relativo e o valor de “p” pelo teste t para amostras independentes. As soluções foram preparadas no mesmo dia, pelo mesmo analista e com o mesmo equipamento.

4.4.3.2 Precisão intermediária

Para a análise da precisão intermediária foram preparadas soluções-mãe de 2000 $\mu\text{g/mL}$ de ácido kójico e diluídas nas concentrações 10, 15, e 20 $\mu\text{g/mL}$, com três leituras para cada ponto. A cada sistema foi adicionado 1,5 mL de solução ácida

(HCl 0,1 M) de cloreto de alumínio 0,2% (p/V) e o volume completado para 10 mL com metanol. As leituras das absorvâncias foram feitas no comprimento de onda 305 nm. As análises foram feitas em dias consecutivos por analistas diferentes e usando equipamentos diferentes. Para cada concentração também foi calculado o DPR, erro relativo e o valor de “p” pelo teste t para amostras independentes.

4.4.4 Exatidão

A exatidão foi determinada através do ensaio de recuperação. À 375 mg de base (creme lanette ou não iônico) foram incorporadas quantidades conhecidas de ácido kójico e, em seguida, diluiu-se adequadamente com metanol e filtrado. Alíquotas adequadas do filtrado foram transferidas para balões volumétricos de 10 ml, aos quais foi adicionado 1,5 mL de solução ácida de cloreto de alumínio 0,2% (p/V) e completado com metanol para o volume de 10 mL, de tal forma a obter soluções contendo concentrações de 10, 15 e 20 µg/mL em ácido kójico. Procedeu-se da mesma forma com as amostras em que foram incorporados em associação de ácido kójico (2%) e hidroquinona (4%), obtendo-se soluções contendo 10, 15 e 20 µg/mL em ácido kójico e 20, 30 e 40 µg/mL em hidroquinona.

A concentração dos analitos foi determinada através da leitura por espectrofotometria no UV nos comprimentos de onda de 305, 315 e 320 nm e as porcentagens de recuperação foram calculadas pelo método, considerando os diferentes comprimentos de onda. Para cada concentração também foi calculado o DPR, erro relativo e o valor de “p” pelo teste t para amostras independentes.

4.4.5 Robustez

O ensaio de robustez tem por objetivo avaliar a capacidade do método de não ser afetado por pequenas e deliberadas variações, fornecendo um indicativo de confiança para o uso do método. Na avaliação da robustez foram testados os seguintes parâmetros: influência da concentração do íon metálico, do tempo de leitura e da temperatura na intensidade de absorvância.

4.4.5.1 Influência do tempo de leitura na intensidade de absorção

Foram preparadas soluções-mãe de ácido kójico 1000 µg/mL, em triplicata, e diluídas em balão volumétrico até 15 µg/mL. Cada balão continha 1,5 mL de solução ácida (HCl 0,1 M) de cloreto de alumínio 0,2% (p/V) e 150 µL da solução-mãe (1000 µg/mL) e completadas com metanol para 10 mL.

As leituras das absorbâncias foram feitas em 305 nm em temperatura controlada de 20°C, nos tempos zero, 24 e 72 horas. Para cada grupo de resultados foram calculados o DPR, o erro relativo e valor de “p” pelo teste t para amostras pareadas.

4.4.5.2 Influência da temperatura na intensidade de absorção

Foram preparadas soluções-mãe de ácido kójico 1000 µg/mL, em triplicata, e diluídas em balão volumétrico até 15 µg/mL. Cada balão continha 1,5 mL de solução ácida (HCl 0,1 M) de cloreto de alumínio 0,2% (p/V) e 150 µL da solução-mãe (1000 µg/mL) e completadas com metanol para 10 mL.

As leituras das absorbâncias foram feitas em 305 nm nas temperaturas 5°C, 20°C e 30°C, após permanecerem por quatro horas nessas condições. Para cada grupo de resultados foram calculados o DPR, o erro relativo e valor de “p” pelo teste t para amostras pareadas.

4.4.5.3 Influência do pH na intensidade de absorção

Foi preparada solução-mãe de ácido kójico 1500 µg/mL e diluída para 150 µg/mL. Em balão de 10,0 mL foram preparadas nove soluções, sendo que em cada balão continha 1,0 mL da solução diluída, 1,5 mL de solução ácida (HCl 0,1 M) de cloreto de alumínio 0,2% (p/V) e pH ajustados com KOH para pH 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 11 e 14 e completadas com metanol para 10 mL. As leituras das absorbâncias foram feitas em 305 nm em temperatura controlada de 20°C. Para cada grupo de resultados foram calculados o DPR, o erro relativo e valor de “p” pelo teste t para amostras pareadas.

4.4.5.4 Influência da concentração do metal na intensidade de absorção

Foram preparadas soluções de ácido kójico (15 µg/mL), variando a concentração de cloreto de alumínio a fim de que houvesse diferentes relações molares entre os reagentes. As proporções avaliadas de AK : Al³⁺ foram de 1 : 0 até 1 : 136.

4.5 ESTUDO DO COMPLEXO

4.5.1 Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção no IV foram obtidos no espectrofotômetro FTIR – MB 100 BOMEM e detector DTGS no Departamento de Química da UFPR. Foram obtidos espectros do padrão, e de liofilizados de soluções aquosas de ácido kójico em pH 9 e 14 e de soluções aquosas de ácido kójico com cloreto de alumínio em pH 1, 11 e 14.

Soluções de ácido kójico (15 µg/mL) com valores de pH 9 e 14, e soluções de ácido kójico com alumínio com valores de pH de 1, 11 e 14 foram liofilizadas. O ajuste de pH para a faixa básica foi feito com KOH. Para pH 1, não houve ajuste. O padrão do analito foi verificado em amostra sólida, sem a utilização da liofilização. Todas as amostras foram preparadas em pastilha de KBr.

Os espectros foram adquiridos com resolução igual a quatro, o número de scans igual a 64, no modo transmitância e tendo como branco o ar. Os espectros foram processados considerando a faixa espectral do infravermelho médio (4000 a 400 cm⁻¹).

4.5.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em espectrofotômetro BRUKER Avance DRX 400 operando na frequência base de 400,13 MHz e 100,63 MHz para os núcleos de ¹H e ¹³C, respectivamente, experimento este realizado no Departamento de Bioquímica da UFPR. Foram obtidos espectros do padrão em solução aquosa (15 mg/mL) em pH 4, 7, 9, 11 e 14,

de soluções de ácido kójico complexado com alumínio na proporção AK 1:1 Al^{3+} em pH 2 e 4.

Os espectros de RMN – ^{13}C DEPT foram obtidos em um θ z de 135° , no qual CH e CH_3 ocorrem em fase positiva em relação à linha de base e CH_2 em fase negativa. As amostras foram solubilizadas em solventes deuterados (D_2O e CD_3OD) e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro para análise a 25°C . Algumas amostras tiveram seus assinalamentos determinados com auxílio dos experimentos bidimensionais COSY e HMBC, sendo estes realizados de acordo com parâmetros indicados no Manual Bruker.

Os deslocamentos químicos expressos em ppm foram determinados utilizando-se:

- padrões internos: Me_4Si (0.00 ppm para ^1H e ^{13}C) ou acetona (2,23 ppm e 30, 20 ppm, ^1H e ^{13}C respectivamente)

- sinal central dos solventes deuterados: CD_3OD (3,31 ppm e 49,15 ppm, ^1H e ^{13}C respectivamente).

4.5.3 Titulação potenciométrica

As titulações potenciométricas foram conduzidas com o método desenvolvido no laboratório de equilíbrio químico (LEQ-UFPR) de acordo com MARTELL e MOTEKAITIS (1988) (MERCE *et al.*, 1998)

Todos os ensaios foram realizados em triplicata em atmosfera inerte de N_2 (White-Martins, Brasil), gás previamente purificado em dois frascos de limpeza contendo soluções de KOH 1 e 0,1 M (Merck, Brasil), em recipiente fechado e mantido a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (Banho termostatzado MQBTC 99-20, Microquímica, Brasil) contendo quantidades exatas de ácido kójico (0,1 mmol, $\geq 98.0\%$, Sigma Aldrich), 372,7 mg de KCl p.a. para ajuste da força iônica (0,100 mol/L) e dissolvidos em 50,00 mL de água purificada ou com adição de 10,00, 5,00 ou 3,00 mL de solução de cloreto de alumínio 0.01 mol/L em ácido nítrico 0.13 mol/L (padrão Merck). A pureza do AK foi determinada nos próprios ensaios de titulação potenciométrica e a solução de AlCl_3 foi padronizado por EAA – espectroscopia de absorção atômica, aparelho modelo AA-220 FS Varian com sips (diluição automática); Lâmpada de Al - cátodo oco com corrente de 10mA; comprimento de onda da leitura: 237,3 nm com abertura de fenda (slit width) de 0,5 nm. Como condições experimentais teve-se

leitura em triplicata com desvio padrão máximo de 1%, chama óxido nitroso (9,11 mL/min.) com acetileno (7,04 mL/min.) em modo de absorbância. A concentração de ácido inorgânico forte $[(H^+)]$ foi determinada por titulação do tipo Gran's Plot de acordo com MARTELL e MOTEKAITIS (1988). A bureta utilizada foi a de pistão, automática, precisão 0.01 mL - (Metrohm 809 Titrand – software TIAMO versão 1.2.1, Suíça), para a adição da solução titulante (KOH padrão, Merck, Brasil, 0.1 M). Os valores de pH foram mensurados diretamente com eletrodos de vidro e Ag/AgCl de referência, calibrados diariamente com 3 soluções tampão (4,01, 7,00 e 9,00). A faixa de pH medido foi de 1,8 a 11,5.

A formação do complexo foi descrito de acordo com a teoria ácido-base (PEARSON, 1963) no qual o ácido (alumínio) é um aceptor de par de elétrons doados pela base que é o AK quando a hidroxila de C-5 está desprotonada.

O software Hyperquad foi utilizado para calcular as constantes de protonação e as constantes de formação global para as espécies complexadas encontradas em porcentagem superior a 10% de todas as espécies metálicas presentes no equilíbrio. O modelo matemático leva em consideração dados de pH das titulações potenciométricas, as constantes de hidrólise para Al^{3+} (BAES e MESMER, 1976) e a quantidade, em milimols, de ácido fólico, de Al^{3+} e de H^+ em todos os sistemas.

Os cálculos foram realizados até a melhor curva simulada coincidir com a experimental. O programa HYSS (ALDERIGH, 1999) calculou o diagrama de distribuição das espécies usando como entrada, os dados calculados previamente pelo HYPERQUAD com o menor desvio padrão possível obtido.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foram utilizados os parâmetros desvio padrão relativo, erro relativo, teste t de Student, teste exato de Fisher, teste de Levene, Tuckey, LSD, ANOVA one way e coeficiente de Pearson..

O teste t de Student permite verificar se dois conjuntos de dados são estatisticamente equivalentes, utilizando, para tanto, as médias e os desvios padrão dos resultados obtidos para cada método. O nível de significância foi definido como $\alpha = 0,05$ e determinado o valor de "p". Foram então formuladas a hipótese nula (H_0) e alternativa (H_1):

- hipótese nula (H_0): Estabelece a ausência de diferença entre os parâmetros, ou seja, não há diferença entre os grupos. As médias dos valores da amostra padrão são iguais aos valores experimentais das variações propostas para o ensaio de robustez.

- hipótese alternativa (H_1): as médias dos valores da amostra padrão são diferentes dos valores experimentais das variações propostas pelo ensaio de robustez

Se pelo teste de hipóteses se verificar que a diferença observada é grande demais para ser explicada somente por uma variável aleatória – acaso – afirma-se que a diferença é estatisticamente significativa. O “p” é a probabilidade exata de se cometer o erro tipo I – rejeita H_0 quando H_0 é verdadeira; expressa a probabilidade de que a diferença tão grande quanto a observada na amostra ocorre somente por acaso; em duas populações “p” é a probabilidade de errar ao se afirmar que a diferença existe.

$p < 0,05$: rejeita a hipótese nula (valores são estatisticamente diferentes)

$p > 0,05$: não rejeita a hipótese nula (valores são estatisticamente iguais)

Caso o valor de “p” seja maior que 0,05 a hipótese nula não é rejeitada e isso não implica em dizer que ela é aceita, uma vez que o número limitado de observações pode não ser uma evidência suficiente para que ela seja rejeitada.

O teste exato de Fisher é um teste de significância estatística utilizados na análise de tabelas de contingência no qual os tamanhos de amostra são pequenas. Se há associações não randômicas entre duas variáveis.

O teste de Levene é um teste não paramétrico usado para testar a homogeneidade das variâncias

O teste de Tuckey é usado para comparação múltipla, quando se deseja comparar todos os pares de médias adotando um único nível de confiança.

O teste LSD (Least Square difference) é um indicador de diferenças significativas. Qualquer diferença entre médias superior a LSD indica que a diferença é significativa.

ANOVA (Análise de Variância com um fator) testa se os grupos são bem modelados por distribuições normais de igual variância, comparamos as médias entre os grupos.

O coeficiente de correlação de Pearson é uma medida do grau de relação linear entre duas variáveis quantitativas. Este coeficiente varia entre os valores -1 e

1. O valor 0 (zero) significa que não há relação linear, o valor 1 indica uma relação linear perfeita e o valor -1 também indica uma relação linear perfeita mas inversa, ou seja quando uma das variáveis aumenta a outra diminui. Quanto mais próximo estiver de 1 ou -1, mais forte é a associação linear entre as duas variáveis.

TABELA 1 - RELAÇÕES MOLARES ENTRE O ÁCIDO KÓJICO E O ALUMÍNIO

mol AK / mol AlCl_3	PM (g/mol) AK/ AlCl_3	Sol.AK (1500 $\mu\text{g/mL}$)	Sol. AlCl_3 0,2g/100mL	mol AK	mol AlCl_3	AK (mg)	AlCl_3 (mg)	Metanol
1 / 135,75	142,11 / 133,43	0,1 mL	9,5590 mL	$1,056 \times 10^{-6}$	$1,43 \times 10^{-4}$	0,15	19,08	qsp 10mL
1 / 90,43		0,1 mL	6,3680 mL	$1,056 \times 10^{-6}$	$9,55 \times 10^{-5}$	0,15	12,74	
1 / 72,35		0,1 mL	5,0950 mL	$1,056 \times 10^{-6}$	$7,64 \times 10^{-5}$	0,15	10,14	
1 / 54,26		0,1 mL	3,8210 mL	$1,056 \times 10^{-6}$	$5,73 \times 10^{-5}$	0,15	7,64	
1 / 36,17		0,1 mL	2,5470 mL	$1,056 \times 10^{-6}$	$3,82 \times 10^{-5}$	0,15	5,10	
1 / 18,08		0,1 mL	1,2730 mL	$1,056 \times 10^{-6}$	$1,91 \times 10^{-5}$	0,15	2,55	
1 / 9,05		0,1 mL	0,6368 mL	$1,056 \times 10^{-6}$	$9,56 \times 10^{-6}$	0,15	1,28	
1 / 7,24		0,1 mL	0,5095 mL	$1,056 \times 10^{-6}$	$7,65 \times 10^{-6}$	0,15	1,02	
1 / 5,43		0,1 mL	0,3821 mL	$1,056 \times 10^{-6}$	$5,73 \times 10^{-6}$	0,15	$7,6 \times 10^{-1}$	
1 / 2,71		0,1 mL	0,1910 mL	$1,056 \times 10^{-6}$	$2,86 \times 10^{-6}$	0,15	$3,8 \times 10^{-1}$	
1 / 2,26		0,1 mL	0,1593 mL	$1,056 \times 10^{-6}$	$2,38 \times 10^{-6}$	0,15	$3,2 \times 10^{-1}$	
1 / 1,80		0,1 mL	0,1273 mL	$1,056 \times 10^{-6}$	$1,90 \times 10^{-6}$	0,15	$2,5 \times 10^{-1}$	
1 / 1		0,1 mL	0,071	$1,056 \times 10^{-6}$	$1,056 \times 10^{-6}$	0,15	$1,4 \times 10^{-1}$	
1 / 0,5		0,1 mL	35,21 μL	$1,056 \times 10^{-6}$	$5,28 \times 10^{-7}$	0,15	$7,0 \times 10^{-2}$	
1 / 0,33		0,1 mL	23,24 μL	$1,056 \times 10^{-6}$	$3,48 \times 10^{-7}$	0,15	$4,6 \times 10^{-2}$	
1 / 0,25		0,1 mL	17,61 μL	$1,056 \times 10^{-6}$	$2,64 \times 10^{-7}$	0,15	$3,5 \times 10^{-2}$	
1 / 0,20		0,1 mL	14,08 μL	$1,056 \times 10^{-6}$	$2,11 \times 10^{-7}$	0,15	$2,8 \times 10^{-2}$	
1 / 0,154		0,1 mL	10,84 μL	$1,056 \times 10^{-6}$	$1,63 \times 10^{-7}$	0,15	$2,2 \times 10^{-2}$	
1 / 0,143		0,1 mL	10,07 μL	$1,056 \times 10^{-6}$	$1,51 \times 10^{-7}$	0,15	$2,0 \times 10^{-2}$	
1 / 0,100		0,1 mL	7,04 μL	$1,056 \times 10^{-6}$	$1,06 \times 10^{-7}$	0,15	$1,4 \times 10^{-2}$	
1 / 0,067		0,1 mL	4,72 μL	$1,056 \times 10^{-6}$	$5,28 \times 10^{-8}$	0,15	$7,0 \times 10^{-3}$	
1 / 0,02		0,1 mL	1,41 μL	$1,056 \times 10^{-6}$	$2,11 \times 10^{-8}$	0,15	$2,8 \times 10^{-3}$	
1 / 0		0,1 mL	0 μL	$1,056 \times 10^{-6}$	0	0,15	0	

Fonte: O AUTOR (2009)

Resultados e discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

O AK é um ácido orgânico fraco, pois possui pKa próximo a 7,9. Na molécula são identificadas as funções álcool, cetona enol e éter. O ácido kójico possui duas hidroxilas – uma alcoólica e outra enólica - e uma carbonila que são estruturas capazes de formar ligações do tipo pontes de hidrogênio, conferindo assim a ele a possibilidade de ser solúvel em solventes como água e metanol.

A hidroxila enólica e a carbonila, grupos eletronegativos, encontram-se em carbonos vicinais, conferindo a esta região a possibilidade de ser a região quelante dos íons metálicos. Na figura 19 são destacadas algumas das várias possibilidades diferentes de complexação através dessa região.

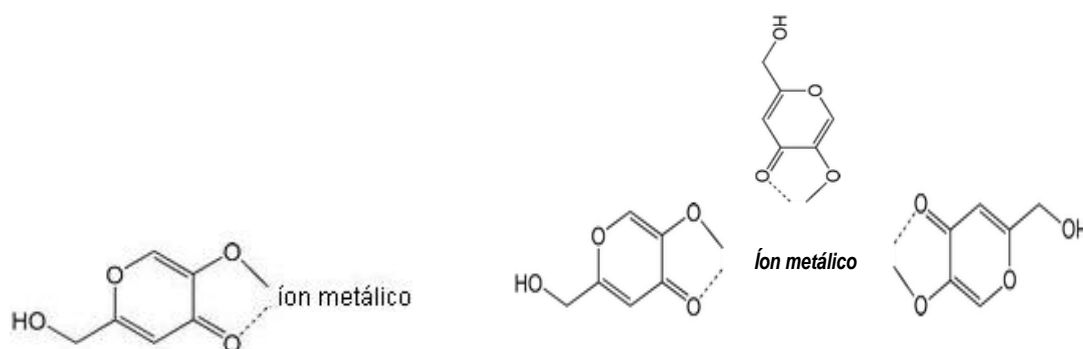


FIGURA 19 - POSSÍVEIS ESTRUTURA SQUELANTES DO AK COM ÍON METÁLICO
FONTE: O AUTOR (2009)

Verifica-se que há insaturações alternadas e pares de elétrons não ligantes, caracterizando assim um cromóforo que absorve na região do ultravioleta (200-400 nm) do espectro eletromagnético, justificando assim o desenvolvimento de um método por espectrometria nessa região. Métodos que se utilizam desta propriedade são chamados espectrofotométricos e preconizam a necessidade de características fundamentais intrínsecas ou adquiridas pela molécula, como a presença de um ou mais cromóforos. Partindo-se deste princípio foi possível o desenvolvimento e validação de um método para quantificação desse analito.

5.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

O desenvolvimento do método é uma etapa de grande importância na qual se define o conjunto de parâmetros que devem ser otimizados para o funcionamento do método. A seqüência básica do desenvolvimento de métodos analíticos de quantificação utilizando a espectrofotometria no ultravioleta passa pela análise de diversos parâmetros, tais como: escolha do solvente, seleção do melhor comprimento de onda, definição da concentração de trabalho mais adequada para o analito, avaliação de possíveis interferentes (seletividade), influência do pH, preparo da amostra, entre outros.

5.2.1 Escolha do solvente e influência do pH

A primeira etapa de desenvolvimento foi verificar o melhor solvente e a influência exercida pelo potencial hidrogeniônico sobre o sistema. O solvente de escolha deve ser capaz de solubilizar o soluto: não deve absorver na mesma região que o analito e, se possível, deve ser de baixo custo e não poluente. A alta solubilidade do AK em metanol e água e o fato destes não apresentarem absorção na região do UV, fez destes possíveis solventes de escolha. Quando se comparam os espectros de varredura obtidos para solução aquosa e solução metanólica de AK (15 µg/ml) observa-se que são muito semelhantes (figura 20), evidenciando duas bandas de absorção de forte intensidade, com máximos em $\lambda = 215$ nm e 269 nm. Observa-se que o AK apresenta uma absortividade molar em 269 nm a 20°C maior em solução aquosa ($\epsilon = 8235$) que em solução metanólica ($\epsilon = 6899$) sendo mais intensa no espectro aquoso. Isto significa que no meio aquoso a sensibilidade é maior.

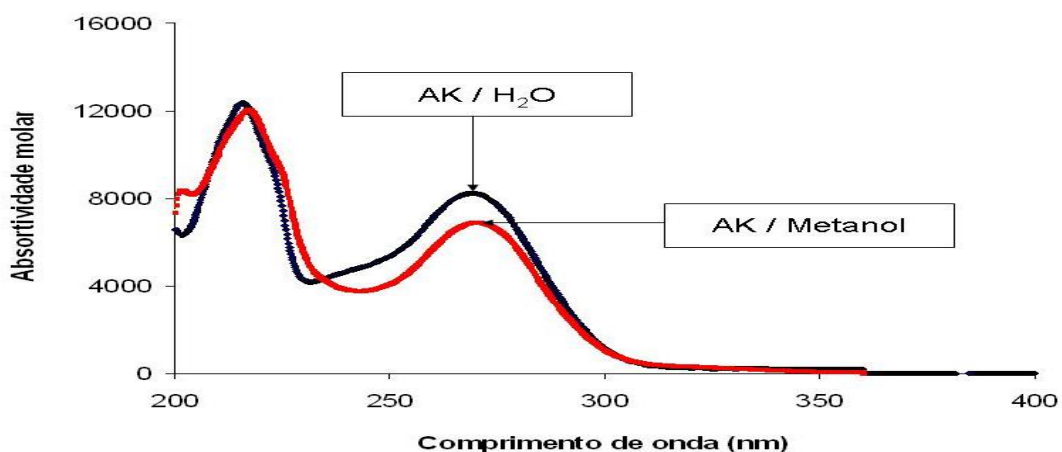


FIGURA 20 - ESPECTROS DE UV DAS SOLUÇÕES AQUOSA E METANÓLICA DE AK (15 $\mu\text{g/ml}$).
FONTE: O AUTOR (2008)

Foi também avaliada a influência do pH no perfil espectral em soluções de mesma concentração de AK (15 $\mu\text{g/ml}$), tanto em meio aquoso ácido e alcalino (figura 21), quanto em meio metanólico ácido e alcalino (figura 22).

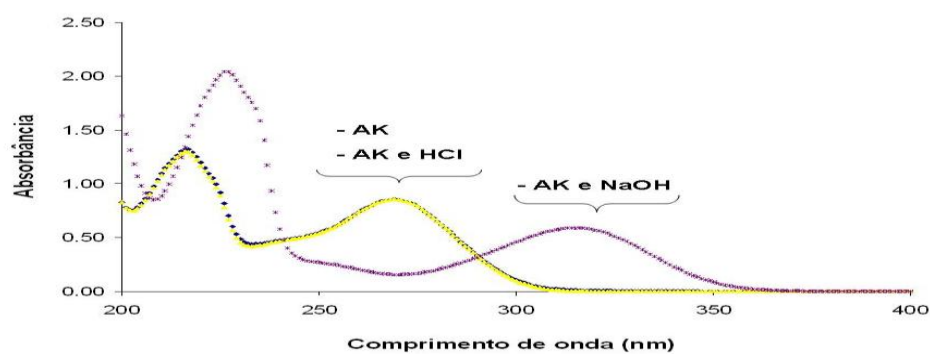


FIGURA 21 - ESPECTRO DE UV DA SOLUÇÃO AQUOSA DE AK (15 $\mu\text{g/ml}$), ACIDIFICADA (pH 2,8) E ALCALINIZADA (pH 10,6) DE AK (15 $\mu\text{g/ml}$)
FONTE: O AUTOR (2008)

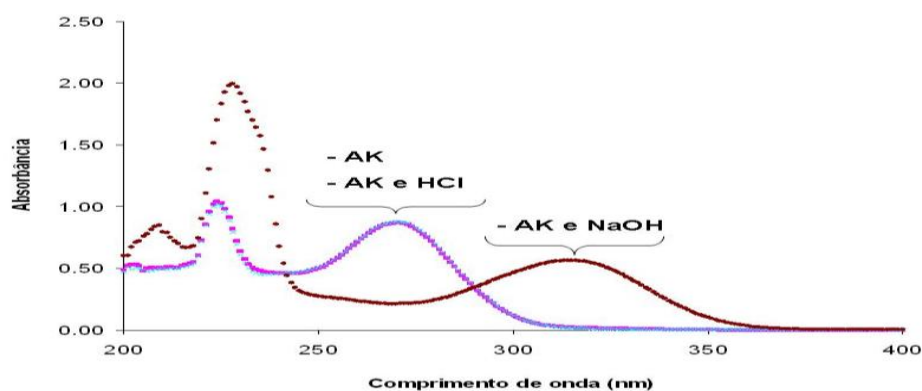


FIGURA 22 - ESPECTRO DE UV DA SOLUÇÃO METANÓLICA DE AK (15 $\mu\text{g/ml}$), ACIDIFICADA (pH 1,2) E ALCALINIZADA (pH 9,5) DE AK (15 $\mu\text{g/ml}$)
FONTE: O AUTOR (2008)

Pode-se verificar que as soluções aquosas e metanólicas de AK, com ou sem adição de ácido clorídrico, geram espectros que se sobrepõem com absorção máxima em 269 nm. Quando o meio se torna básico, pela adição de hidróxido de sódio, a ionização muda o arranjo eletrônico e, conseqüentemente, o cromóforo. Como resultado, há um deslocamento do tipo batocrômico, ou seja, para comprimentos de onda maiores (de $\lambda = 269$ nm para $\lambda = 315$ nm) e hipocrômico (diminuição da intensidade da absorção).

Pelos espectros obtidos nos diferentes meios e pHs, os dois solventes demonstram ser adequados para o desenvolvimento do método por UV.

5.2.2 Seleção do comprimento de onda

A seleção do comprimento de onda foi feita através do espectro de varredura e a análise dos picos de absorção máxima do analito. As absorções máximas ocorreram em 215 nm e 269 nm como pode ser observado na figura 23. O $\lambda_{\text{máx}}$ de trabalho deve ser preferencialmente maior que 220 nm e não apresentar problemas de linearidade.

A ampla maioria dos compostos que absorvem na região do ultravioleta o fazem próximo a 200 nm. Cromóforos mais específicos podem ser obtidos por alterações no pH, reações de derivatização, complexação, entre outros. Neste caso observou-se que o analito poderia complexar com cátions metálicos o que, teoricamente, poderia levar a um deslocamento batocrômico e, assim, dar mais seletividade ao método. Uma vez verificada e confirmada essa possibilidade foram feitas soluções com AK e cloreto de alumínio e avaliada a linearidade. A partir de 17 amostras com concentrações variando de 0,1 a 50 $\mu\text{g/mL}$ foram obtidas as curvas analíticas para os vários comprimentos de onda do espectro de 200– 400 nm (figura 23) e calculados os coeficientes de correlação para as retas obtidas nos diferentes comprimentos de onda na região de 200– 400 nm. Os valores de “r” foram representados graficamente versus comprimento de onda, para avaliar a região de melhor proporcionalidade (figura 23). No intervalo entre 273 nm e 329 nm os valores de “r” obtidos estão acima de 0,999 (figura 24). Logo, é possível utilizar a região no intervalo de 305 nm e 320 nm.

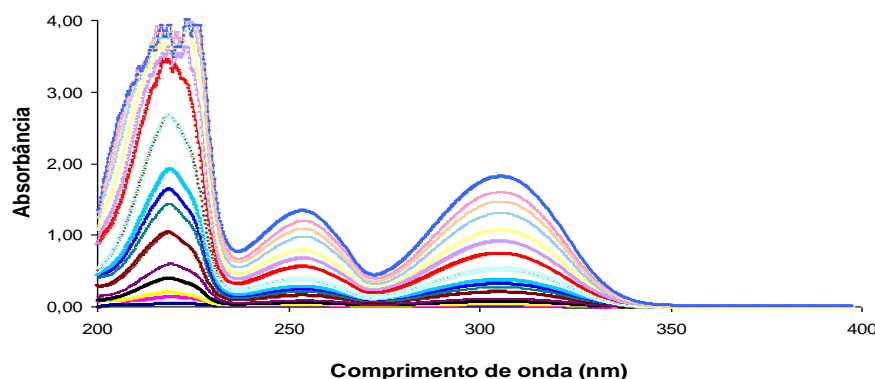


FIGURA 23 - ESPECTROS DE UV DE SOLUÇÕES METANÓLICAS CONTENDO AK 0,1-50 µg/ml E SOLUÇÃO ÁCIDA DE CLORETO DE ALUMÍNIO 0,2%
 FONTE: O AUTOR (2008)

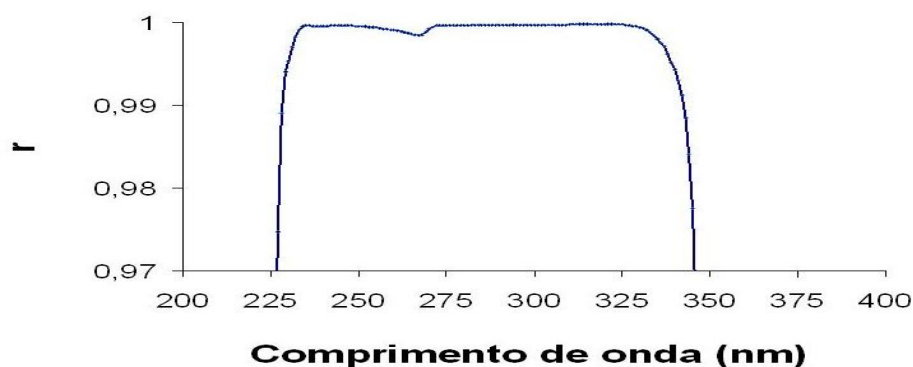


FIGURA 24 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO VERSUS COMPRIMENTOS DE ONDA DO CONJUNTO DE SOLUÇÕES METANÓLICAS DE AK 0,1-50 µg/ml EM SOLUÇÃO ÁCIDA DE CLORETO DE ALUMÍNIO 0,2%
 FONTE: O AUTOR (2008)

5.2.3 Avaliação da seletividade

Em técnicas que envolvem a espectroscopia no UV o parâmetro mais comumente otimizado é o comprimento de onda. Isto se dá pelo fato de que uma infinidade de moléculas absorvem comprimentos de onda próximos aos 200 nm e, por isso, deve-se tentar ao máximo criar mecanismos para que o analito de interesse absorva em comprimentos de onda maiores, fora dessa região. Para melhorar a seletividade, em geral, deve-se deslocar a absorção para comprimentos de onda onde um número menor de moléculas absorve, ou seja, mais para o visível. Um dos recursos para um deslocamento batocrômico é a formação de complexos que absorvem de modo diferente do analito individualmente. Em 1976 Kotani *et al.* estudaram a atividade do AK como bacteriostático e, concomitantemente, o potencial quelante do mesmo com íons cobre e cádmio. Tendo em vista esta

propriedade quelante do analito, utilizou-se cloreto de alumínio para obter um complexo que promovesse um deslocamento do tipo batocrômico e, assim, aumentar a seletividade do método.

Com dois grupos muito eletronegativos em carbonos vicinais e uma das hidroxilas ao lado de um oxigênio de carbonila, confere-se a esta região da molécula de AK a possibilidade de quelar íons metálicos, como está circundado na figura 25-A.

Na porção inferior da molécula tem-se um carbono ligado à hidroxila alcoólica, que é do tipo sp^3 e, por isso, tem rotação livre, fazendo com que a hidroxila possa estar espacialmente muito próxima do oxigênio da ligação éter (figura 25-B). Essa região, também muito eletronegativa, se assemelha muito com a porção superior da molécula, fazendo com que também seja teoricamente possível a complexação através dessa porção.

Em estudos preliminares de ressonância magnética nuclear verificou-se que a região em que há modificação no deslocamento químico dos carbonos e em que deve ocorrer preferencialmente a ligação é a que se visualiza na região circundada na figura 25-A.

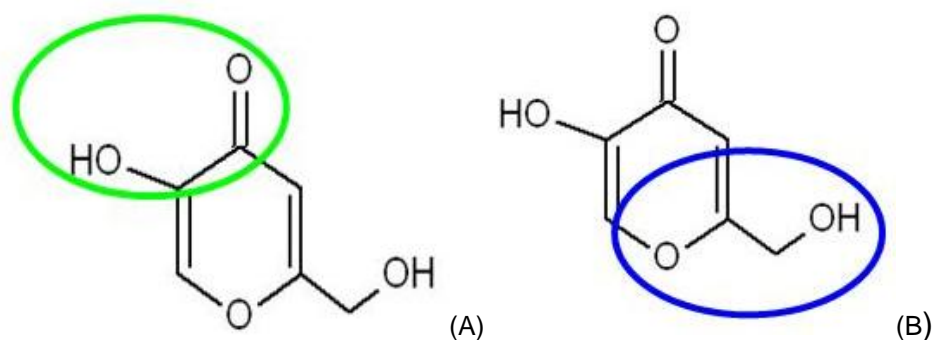


FIGURA 25 – REGIÃO DE MAIOR (A) E MENOR (B) PROBABILIDADE DE ESTAR ENVOLVIDA NA LIGAÇÃO DO AK COM ÍONS METÁLICOS
FONTE: O AUTOR (2009)

As coordenações do AK com o alumínio podem ser mais estáveis em meio metanólico que em meio aquoso, no qual as moléculas de água poderiam estar competindo com o AK na formação do aquo-complexo.

Quando se comparam os espectros das soluções de AK (15 $\mu\text{g/mL}$) em solução ácida de AlCl_3 0,2%, tanto em meio aquoso (pH 1,0) quanto em meio metanólico (pH 1,7), figura 26, observa-se que o complexo em meio metanólico apresenta um máximo de absorção em comprimento de onda maior ($\lambda = 305 \text{ nm}$) que em meio aquoso ($\lambda = 298 \text{ nm}$).

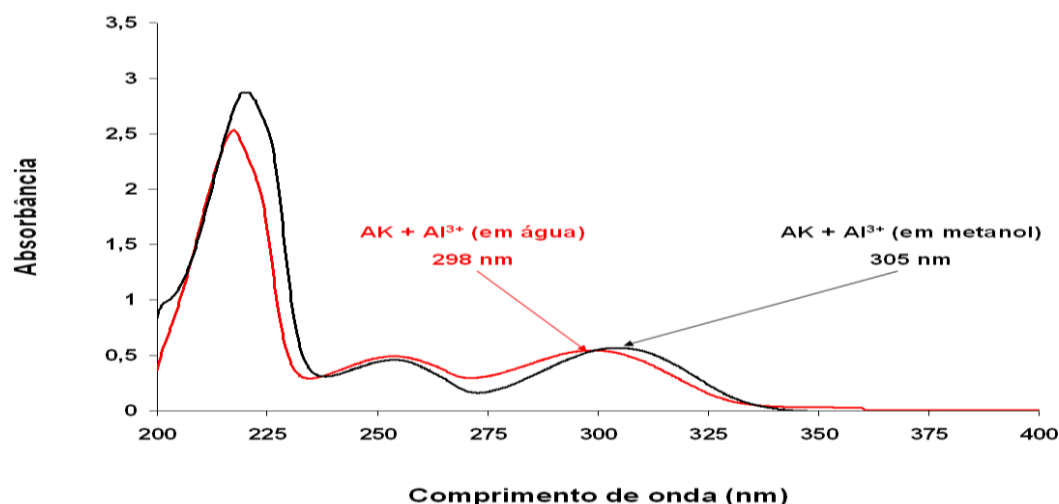


FIGURA 26 - ESPECTRO DE UV DA SOLUÇÃO AQUOSA E METANÓLICA DE AK (15 µg/ml) COM SOLUÇÃO ÁCIDA DE AlCl_3 0,2%
FONTE: O AUTOR (2008)

Essas bandas de absorção intensa em 298 nm (água) e 305 nm (metanol) não existem no espectro de solução aquosa ou metanólica do AK sem cloreto de alumínio sendo, portanto, um indicativo da formação do complexo AK-Al. No meio aquoso a banda de absorção que antes estava em 269 nm se desloca para 298 nm e no metanólico o deslocamento é ainda maior, de 269 nm para 305 nm, ocorrendo assim, para ambos, um deslocamento do tipo batocrômico (para comprimentos de onda maiores), ou seja, o meio metanólico parece ser um pouco mais seletivo que em meio aquoso.

Muitos complexos inorgânicos e orgânicos exibem deslocamento por transferência de carga. Este consiste de um grupo doador de elétrons ligado a um que os aceitam. Quando este produto absorve radiação, um elétron do doador é transferido a um orbital que está associado ao aceitador. O estado excitado é, portanto, um produto de um tipo de processo interno oxidação/redução. Este comportamento difere de outros cromóforos orgânicos no qual o elétron excitado está em um orbital molecular que é dividido por dois ou mais átomos (SKOOG *et al.*, 2000).

Para a quantificação do AK em creme cosmético foi importante avaliar se algum componente da formulação base absorveria no UV de forma a interferir na quantificação do analito. Para esta avaliação, foram adquiridas duas formulações de AK em creme não iônico e o creme lanette. Na composição das mesmas foram identificados os conservantes metilparabeno (nipagin[®]) e propilparabeno (nipazol[®]) – figura 27.

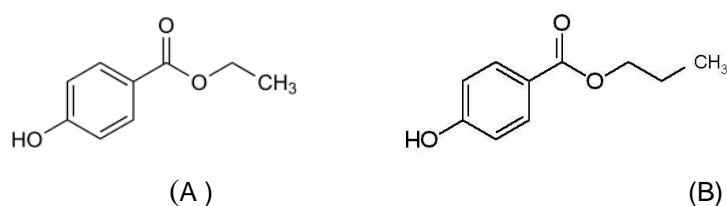


FIGURA 27 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DO METILPARABENO (A), PROPILPARABENO (B)
 FONTE: THE INDEX MERCK (1983)

Tanto o Nipagin[®], quanto o Nipazol[®] absorvem na região do UV. Quando em solução aquosa acidificada os espectros são praticamente iguais, com máximo de absorção em 256 nm e 257 nm, respectivamente. Em meio metanólico o nipagin[®] não se solubilizou, sendo possível separá-lo da amostra por meio físico. O Nipazol[®] em metanol, tem um máximo de absorbância em 257 nm

Outro interferente é a hidroquinona, um ativo comumente prescrito em associação com o AK em tratamentos de clareamento de pele. Os espectros das soluções de hidroquinona (20 µg/ml) em água e em metanol acidificados são praticamente iguais entre si, diferindo nos comprimentos de onda máximos, no meio aquoso $\lambda = 290$ nm e no meio metanólico $\lambda = 294$ nm.

Considerando que os conservantes (nipagin e nipazol) não se complexam com o cátion alumínio e, por isso não tem a banda de absorção deslocada, pode-se dizer que o sistema formado pelo AK em meio metanólico com cloreto de alumínio é mais seletivo. Deve-se considerar também que em pH alcalino, apesar do AK apresentar um máximo de absorção em 315 nm, há a possibilidade de degradação do mesmo neste pH e o nipazol também tem um deslocamento batocrômico que interfere na quantificação nesse meio alcalino.

Com o objetivo de se verificar a seletividade foram também obtidos os espectros de cremes comerciais, creme lanette contendo 2% de AK em associação ou não com HQ 4%, o próprio creme base e solução do padrão de AK, todos na mesma concentração (15 µg/ml) do analito (figura 28). Observa-se que a absorção do creme base mais intensa ocorreu na região entre 250-260 nm o que era esperado devido ao nipazol. Observa-se também que o creme base não apresenta interferência alguma em 305 nm região de absorção máxima da solução do padrão de AK com cloreto de alumínio. Quando comparamos o espectro obtido da solução do creme lanette contendo 2% AK com o do padrão observamos que eles diferem em intensidade em torno de 260 nm provavelmente pela presença do conservante

na amostra, mas próximo a 300 nm os espectros do padrão e da amostra são perfeitamente sobreponíveis. Na amostra que continha AK e HQ nota-se um aumento significativo tanto na região de 260 nm como 300 nm pelo fato de que se somam as absorções dos conservantes, do próprio AK e da hidroquinona. Em creme não iônico, sob as mesmas condições, os resultados foram exatamente iguais.

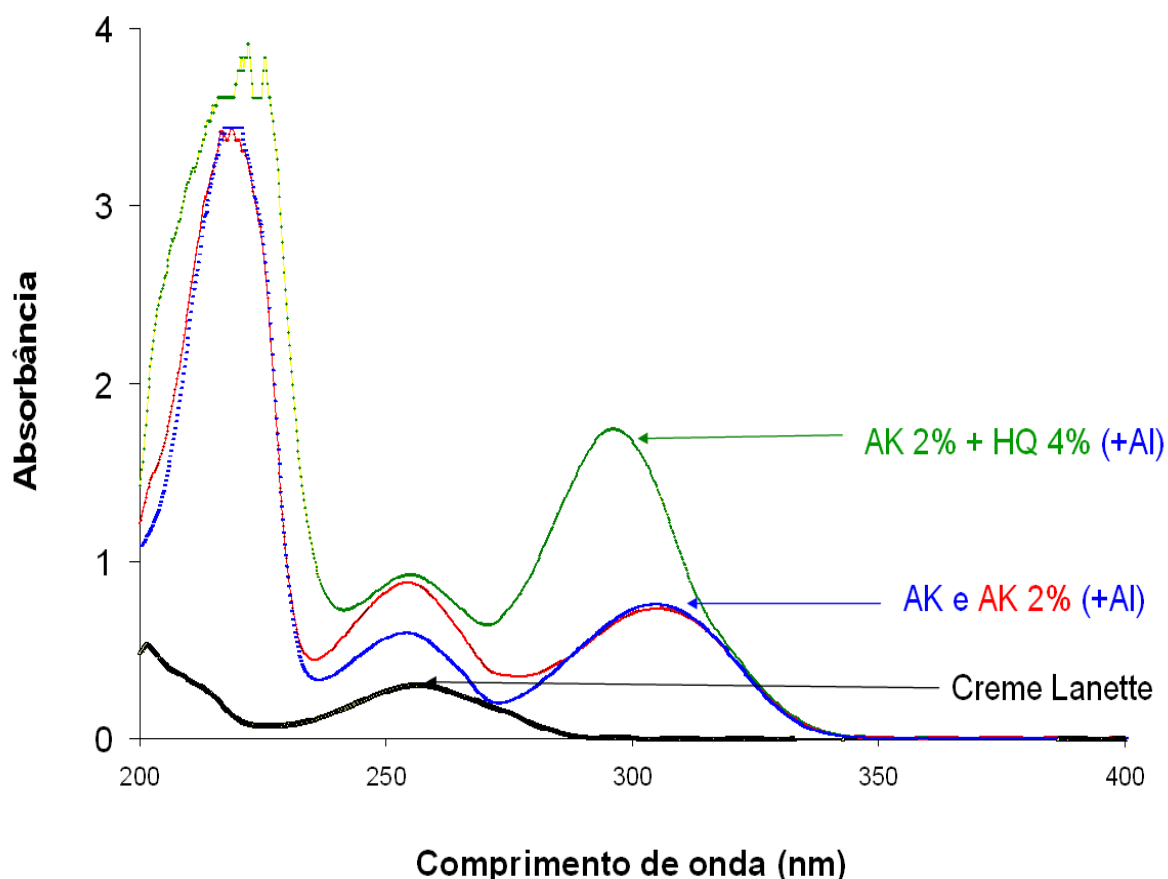


FIGURA 28 – ESPECTROS DE UV DE SOLUÇÕES METANÓLICAS DE AK (15 µg/mL) CREME LANETTE CONTENDO AK 2% EM ASSOCIAÇÃO OU NÃO COM HQ 4% E SOMENTE O CREME LANETTE. TODOS COM ADIÇÃO DE SOLUÇÃO ÁCIDA DE AlCl_3 0,2%
 FONTE: O AUTOR (2008)

Isso significa que para produto que contém apenas AK e conservantes o comprimento de onda em 305 nm é adequado para quantificação do analito. Entretanto, se for um produto de AK com hidroquinona é necessário escolher outro comprimento de onda. Nota-se que um comprimento de onda que poderia ser adequado seria de $\lambda = 320$ nm, já que não há mais absorção da hidroquinona (figura 29), nessas condições.

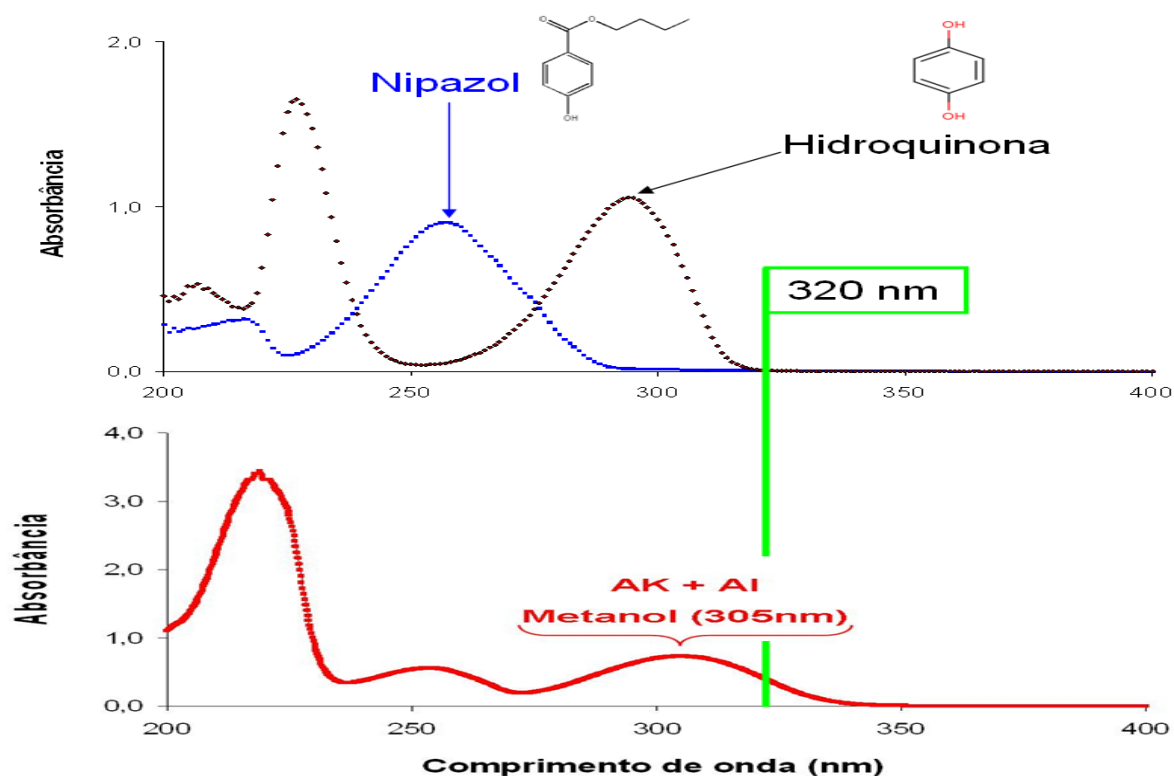


FIGURA 29 – ESPECTROS DE UV DA SOLUÇÃO METANÓLICA DO AK (15 $\mu\text{g/mL}$) COM CLORETO DE ALUMÍNIO EM COMPARAÇÃO COM ESPECTROS DE ABSORÇÃO DA HIDROQUINONA E NIPAZOL EM METANOL
 FONTE: O AUTOR (2008)

Uma das formas de se demonstrar que esse comprimento de onda (320 nm) é adequado para quantificação é construir curvas analíticas e calcular o coeficiente de correlação de cada ponto na região de análise. Foram preparadas 17 amostras de solução metanólica com cloreto de alumínio com concentrações de AK variando na faixa de 0,1 a 50 $\mu\text{g/mL}$. Como a região de comprimento de onda $\lambda = 320 \text{ nm}$ tem um coeficiente de correlação superior a 0,999 pode ser considerado como adequado para quantificação de AK quando em associação com hidroquinona.

Fez-se também a avaliação da seletividade através da estatística, utilizando o teste t para comparação de médias pareadas com o analito com e sem a matriz.

Os valores de “p” para os conjuntos de dados referentes à comparação de dados de AK na concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$ em 305, 315 e 320 nm com e sem as matrizes Lanette e Creme Não Lônico, são maiores que 0,05. Isto significa que não se deve rejeitar a hipótese nula e os valores são estatisticamente iguais. Quando se tem a adição de hidroquinona às matrizes os valores de “p” para 269 e 305 nm são menores que 0,05, e apenas para 320 nm eles são maiores, indicando que nesse comprimento de onda os valores são estatisticamente iguais.

5.2.4 A proporção molar AK e Alumínio

Um aspecto importante é garantir que a limitação de resposta não seja por falta de reagente, ou seja, que todo o analito seja complexado e quantificado, e que o alumínio esteja em excesso em relação a um valor teórico. Do outro lado não se pode colocar um excesso de forma aleatória, pois a quantidade de alumínio na solução final pode influenciar na leitura seja pela densidade ou índice de refração elevado. Foram feitas análises variando a relação molar com a concentração de AK fixa e aumentando a concentração de cloreto de alumínio desde AK : Al^{3+} na proporção 1:0 até 1:136

Os valores obtidos de absorvância pelas relações molares AK : Al^{3+} no comprimento de onda de 305 nm estão na figura 30.

À medida que essa relação aumenta no sentido de ter mais alumínio os valores aumentam até estabilizar em uma proporção próxima de 1:1. A partir desse ponto até a relação 1 : 136 não há mais diferença estatística entre os valores de absorvância obtidos.

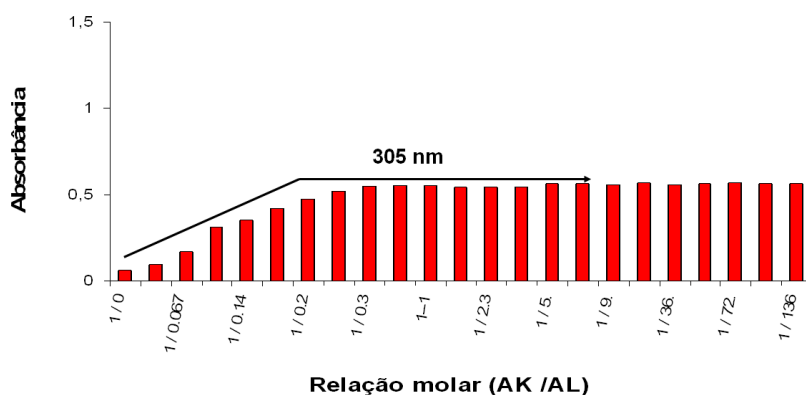


FIGURA 30 – GRÁFICO DA ABSORBÂNCIA DAS SOLUÇÕES NA VARIAÇÃO MOLAR DE AK (15µg/mL) COMPLEXADO COM AlCl_3 (0,2%) EM 305 nm
FONTE: O AUTOR (2008)

A relação completa de todas as variações molares pode ser visualizada através da figura 31, desde AK : Al^{3+} na proporção 1: 0, em que a absorção é maior em 269 nm, até 1 : 136 em que a absorção máxima se dá em 305 nm.

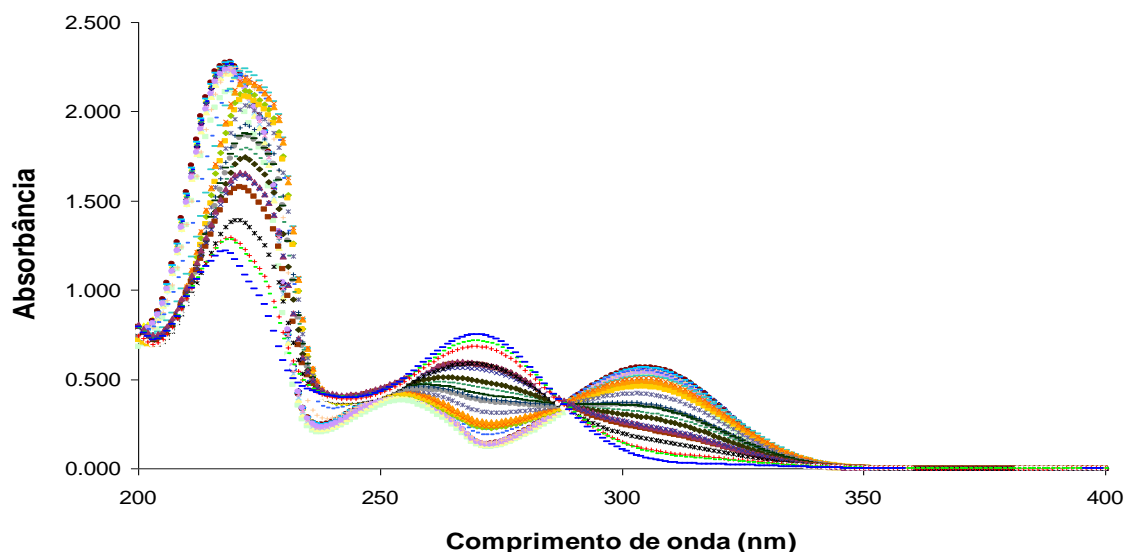


FIGURA 31 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO UV DE SOLUÇÕES METANÓLICAS COM AK E AlCl_3 EM DIFERENTES RELAÇÕES MOLARES
 FONTE: O AUTOR (2008)

Depois de finalizada a etapa de desenvolvimento o método ficou definido com os seguintes parâmetros: solvente metanol; AK : Al^{3+} na proporção molar 1 : 20, $\lambda = 305$ nm para matéria-prima e produto, quando não associado, e $\lambda = 320$ nm para produto, quando associado à hidroquinona; sistema de filtração: papel quantitativo.

5.3 VALIDAÇÃO

O método desenvolvido foi validado de acordo com as normas nacionais e internacionais para determinação de princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matéria-prima. Os parâmetros analisados foram linearidade e intervalo; seletividade; precisão; exatidão e robustez.

5.3.1 Linearidade e intervalo

A linearidade do método foi avaliada através da proporcionalidade entre duas grandezas, concentração e absorbância. O método com cloreto de alumínio em metanol para matéria-prima é linear para quantificação de AK em 305 nm no intervalo entre 5 a 50 $\mu\text{g/mL}$, com um coeficiente de correlação de 0,9998 (figura 32) e na faixa de 10-20 $\mu\text{g/mL}$ (figura 33), como no creme Lanette sem hidroquinona (figura 34) ou com hidroquinona em 320 nm (figura 35). Valores satisfatórios por atender o exigido pelo INMETRO, que é de 0,9, e pela ANVISA que é de 0,99.

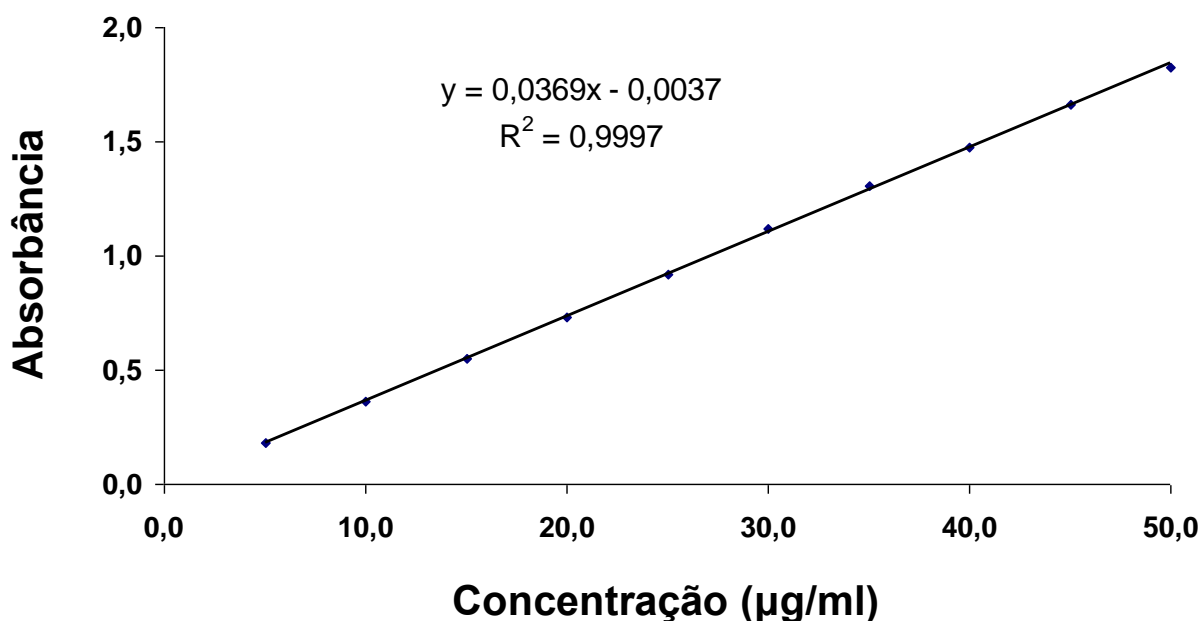


FIGURA 32 – RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE AK COM AlCl_3 DE 5-50 $\mu\text{g/mL}$ EM 305 nm NO MEIO METANÓLICO
FONTE: O AUTOR (2008)

A faixa de trabalho foi de 10 a 20 $\mu\text{g/ml}$ (figura 33) e a concentração de trabalho definida como 15 $\mu\text{g/ml}$. A variação desta concentração foi de aproximadamente 65 a 135%. Valores estes que contemplam a faixa mínima de 80 a 120%, recomendada pela ANVISA.

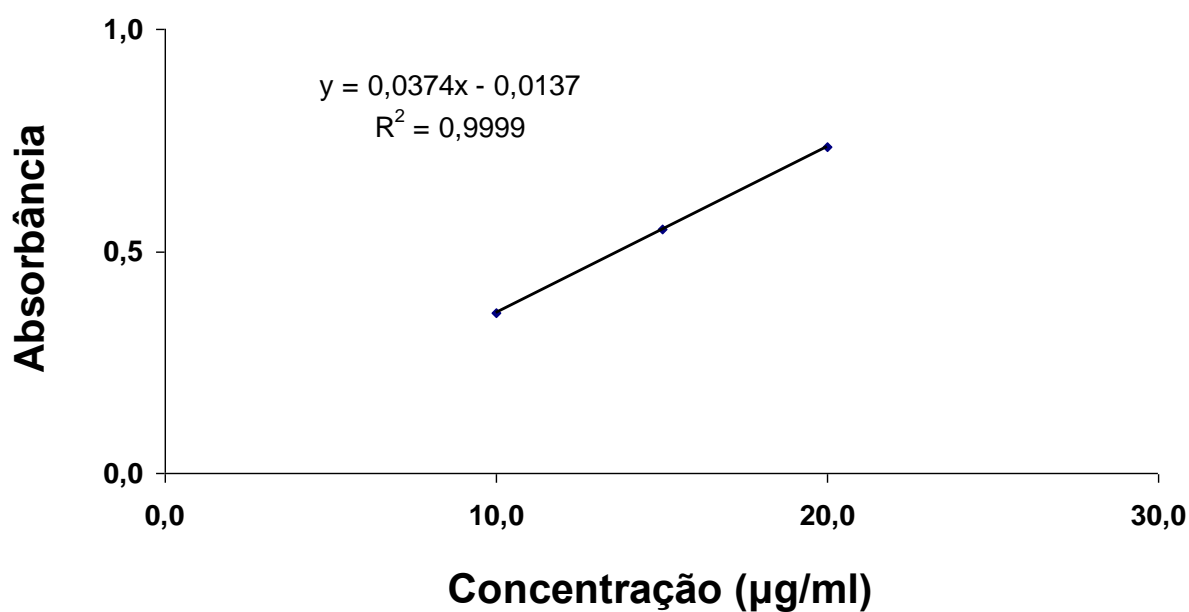


FIGURA 33 – RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE AK COM AlCl_3 DE 10-20 $\mu\text{g/mL}$ EM 305 nm NO MEIO METANÓLICO
FONTE: O AUTOR (2008)

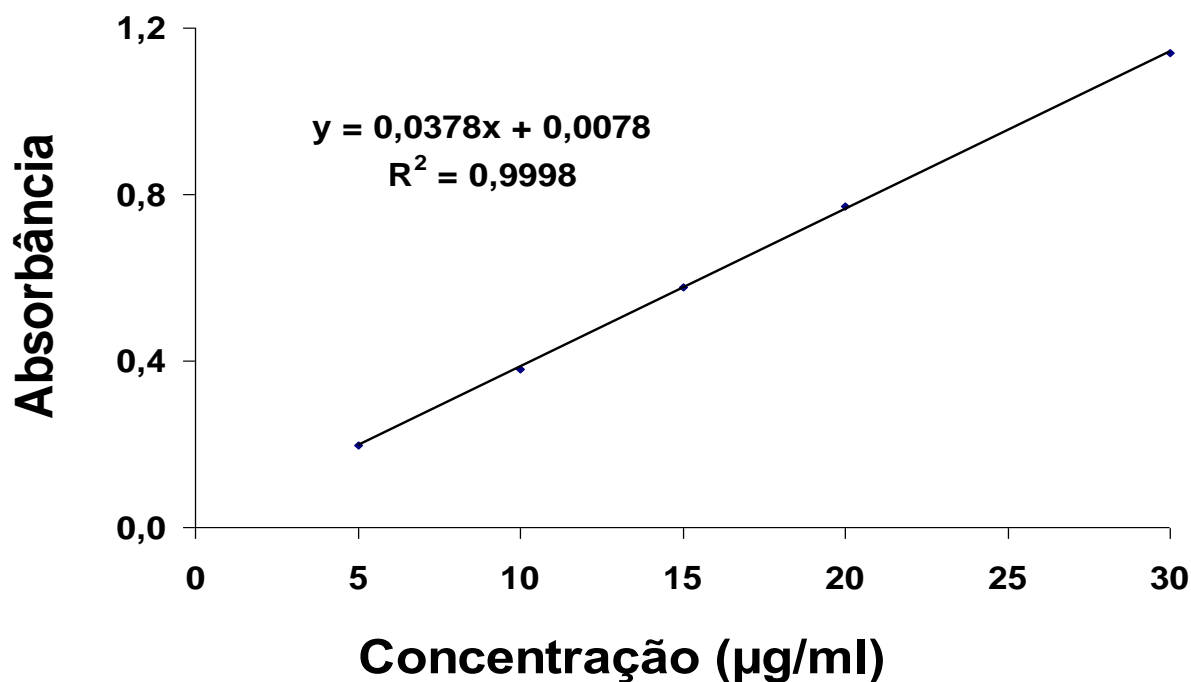


FIGURA 34 – RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE PELA RECUPERAÇÃO DE AK EM CREME LANETTE COM AlCl_3 DE 5-30 $\mu\text{g/mL}$ EM 305 nm NO MEIO METANÓLICO
FONTE: O AUTOR (2008)

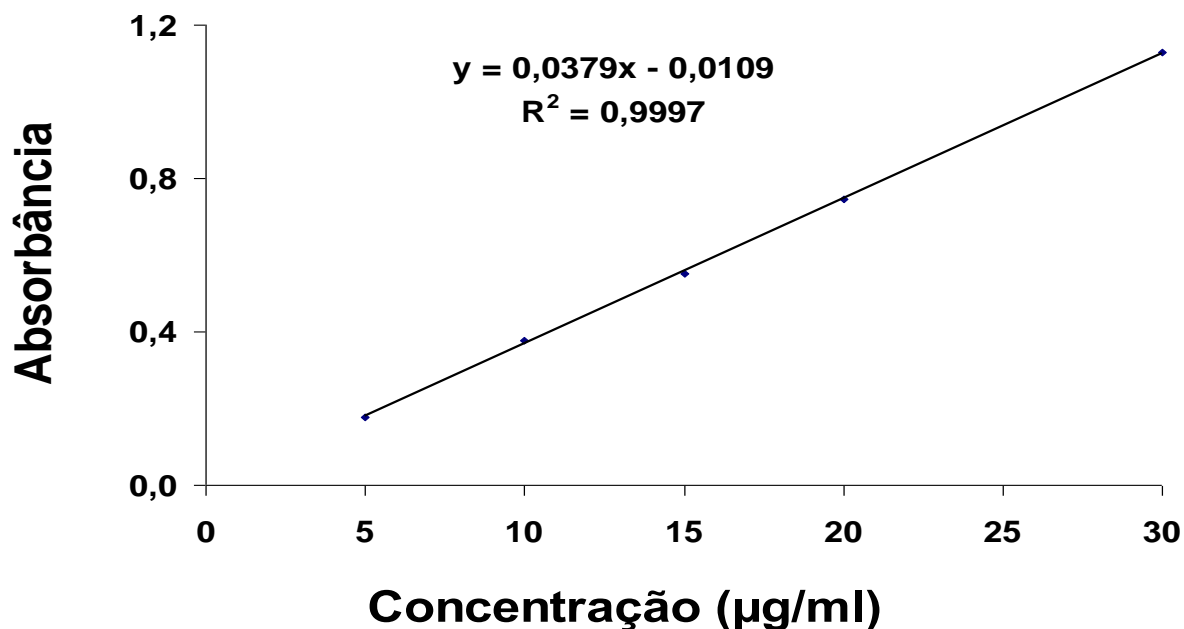


FIGURA 35 – RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE PELA RECUPERAÇÃO DE AK EM PRESENÇA DE HIDROQUINONA EM CREME LANETTE COM AlCl_3 DE 5-30 $\mu\text{g/mL}$ EM 320 nm NO MEIO METANÓLICO
FONTE: O AUTOR (2008)

Para se testar se a característica estudada da amostra é oriunda de uma população com distribuição normal. Foi aplicado o teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov ao conjunto de dados da linearidade na faixa de concentração de 5-50 µg/mL de AK na matéria-prima em 305 nm e também para produto acabado de AK sem hidroquinona em 305 nm de 5-30 µg/mL e com hidroquinona em 320 nm de 5-30 µg/mL. O teste é baseado na maior diferença absoluta entre a frequência acumulada observada e a estimada pela distribuição normal.

Como o número de amostras é menor que 100 os valores calculados devem ser comparados com os valores tabelados. Para a matéria-prima o valor calculado é igual a 0,321, menor que o valor tabelado igual a 0,410 (para $n=10$ e significância de 0,05). Para o produto acabado os valores calculados foram iguais a 0,311 (AK 2 %) e 0,309 (AK 2 % + HQ 4 %), que são menores que o valor tabelado igual a 0,565 (para $n= 5$ e significância de 0,05). Como os valores calculados são menores que cada respectivo valor crítico tabelado a hipótese nula não é rejeitada e conclui-se que os valores nessa população seguem a distribuição normal. O valor de “p” também foi calculado e foi igual a 1,000. Isto significa que não há evidência suficiente para rejeitar a hipótese nula, que corrobora com o resultado encontrado no teste de Kolmogorov-Smirnov. Os valores mínimos do resíduo padrão foi de -1,187 e o máximo de 1,343 para AK matéria-prima e mínimo de -1,079 (AK 2 %), - 0,937 (AK 2 % + HQ 4 %) e o máximo de 1,102 (AK 2 %), 0,875 (AK 2 % + HQ 4 %) para produto acabado, o que indica que os valores estão próximos do ponto zero e dentro da curva normal. A razão das médias quadráticas da regressão pelas médias quadráticas dos resíduos foi de 17839 para AK matéria-prima e 16406 (AK 2 %) e 6683 (AK 2 % + HQ 4 %) para produto acabado, ou seja, muito maiores que os valores de F tabelado dos dados para matéria-prima ($F_{\text{tab } 1,8} = 5,3177$) e dos dados para produto acabado ($F_{\text{tab } 1,3} = 10,13$), por isso rejeita-se a hipótese nula e aceita-se o modelo linear como adequado.

5.3.2 Sensibilidade

A sensibilidade foi verificada pelo limite de detecção e quantificação. O limite de detecção calculado foi de 0,15 µg/mL e o limite de quantificação foi de 0,46 µg/mL..

5.3.3 Precisão

É a avaliação da dispersão de resultados entre ensaios independentes e foi avaliada em dois níveis: repetitividade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dias).

5.3.3.1 Repetitividade

É o grau de concordância entre os resultados de mensurações de um mesmo analito por um único analista em um mesmo equipamento num curto espaço de tempo. A repetitividade foi avaliada através do DPR (desvio padrão relativo) obtido para cada conjunto de dados das concentrações de 10, 15 e 20 µg/mL. Este ensaio visa representar se há concordância entre os resultados das leituras de modo sucessivo do método a ser validado.

Os resultados para a repetitividade encontram-se na tabela 02, sendo que cada valor para cada concentração representa a média de três leituras consecutivas. Em todas as concentrações testadas o valor de DPR é menor que o estabelecido pela norma vigente que preconiza 5%. Isso satisfaz o critério para a repetitividade e indica que o método apresenta boa precisão intra-dia.

TABELA 02 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE AK E ERRO RELATIVO NA AVALIAÇÃO DA REPETITIVIDADE

Concentração (µg/mL)	10	15	20
A 1	9,902	14,799	20,089
A 2	9,939	14,720	20,084
A 3	9,964	15,069	20,097
A 4	9,872	14,951	19,749
A 5	9,866	14,791	19,911
A 6	9,876	14,835	19,737
Média	9,903	14,861	19,945
DP	0,040	0,127	0,171
DPR	0,406	0,855	0,857
Erro relativo (%)	0,325	0,684	0,686

FONTE: O AUTOR (2008)

Pelo teste t para amostras independentes para cada uma das concentrações de 10, 15 e 20 µg/ml o valor de “p” foi de 0,076, 0,357 e 0,777 respectivamente, assumindo-se variâncias iguais e como os valores são maiores que 0,05 não se deve rejeitar a hipótese nula e os valores são estatisticamente iguais.

5.3.3.2 Precisão intermediária

É a precisão avaliada sobre a mesma amostra por analistas, equipamentos e em dias diferentes. Para a avaliação da precisão intermediária foram realizadas análises em dias consecutivos e verificados através do DPR (desvio padrão relativo) obtido para cada conjunto de dados das concentrações 10, 15 e 20 µg/ml.

Os resultados para a repetitividade encontram-se na tabela 03, sendo que cada valor para cada concentração representa a média de três leituras consecutivas. Em todas as concentrações testadas o valor de DPR é menor que o estabelecido pela norma vigente que preconiza 5%. Isso satisfaz o critério para a precisão intermediária e indica que o método apresenta boa precisão intermediária.

TABELA 03 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE AK E ERRO RELATIVO NA AVALIAÇÃO DA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

			Concentração (µg/ml)		
Dia / Equipamento / Amostra			10	15	20
1	1	A 1	9,872	14,799	19,749
1	1	A 2	9,866	14,720	19,911
1	1	A 3	9,876	15,069	19,737
2	2	B 1	9,585	14,743	20,028
2	2	B 2	9,475	14,735	19,936
2	2	B 3	9,434	14,663	19,845
Média			9,685	14,788	19,868
DP			0,210	0,144	0,113
DPR			2,171	0,976	0,568
Erro relativo (%)			5,319	0,781	0,455

FONTE: O AUTOR (2008)

Foi calculado o “p” pelo teste t para amostras independentes para cada uma das concentrações de 10, 15 e 20 µg/ml, entres os dias 1 e 2. O valor de “p” para a concentração de 10 µg/ml foi de 0,010 assumindo-se variâncias iguais. Como o valor foi menor que 0,05, significa que deve-se rejeitar a hipótese nula em que os dois conjuntos de dados seriam iguais. Para as concentrações de 15 e 20 µg/ml os valores de “p” foram 0,242 e 0,149 respectivamente quando se assumem variâncias iguais. Valores estes maiores que 0,05 e, neste caso, não se deve rejeitar a hipótese nula e os valores entre o dia 1 e 2 são estatisticamente iguais.

5.3.4 Exatidão

Expressa o grau de concordância entre um valor dado como referência aceito como verdadeiro e o valor encontrado na prática. Para a verificação da exatidão do método para quantificação do AK por espectrofotometria no UV utilizou-se o ensaio de recuperação. Quantidades conhecidas de AK foram incorporadas às bases creme Lanette ou creme não iônico, com adição ou não de hidroquinona. Neste caso uma concentração de 2% para AK e 4% para HQ para simular as concentrações em que são vendidas no comércio. As soluções foram diluídas até concentrações de 10, 15 e 20 µg/mL e com a adição de 1,5 mL de cloreto de alumínio 0,2% ($[H^+] = 0,1 \text{ M}$) quando completados para 10 mL com metanol foram lidas em 305, 315 e 320 nm em espectrofotômetro UV. As análises foram realizadas em triplicata e cada amostra avaliada em três comprimentos de onda. Os resultados da recuperação de AK em creme Lanette podem ser visualizados na tabela 04, e com presença de hidroquinona em Lanette, na tabela 05.

Tabela 04 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE AK NO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO EM CREME LANETTE E ERRO RELATIVO

Conc. teórica (µg/ml)	λ (nm)	Concentração (µg/ml)			Média	DP	DPR	Recuperação (%)	Erro relativo (%)
10	305	10,15	10,13	10,09	10,12	0,030	0,294	101,24	0,341
	315	10,22	10,20	10,16	10,20	0,033	0,327	101,90	0,339
	320	10,31	10,29	10,24	10,28	0,036	0,354	102,80	0,397
15	305	14,93	14,92	14,94	14,93	0,011	0,072	99,53	0,076
	315	14,98	15,00	14,97	14,99	0,015	0,103	99,90	0,115
	320	15,05	15,03	15,06	15,04	0,019	0,124	100,30	0,115
20	305	19,94	19,92	19,86	19,91	0,039	0,197	99,53	0,237
	315	20,04	20,03	19,96	20,01	0,042	0,211	100,06	0,247
	320	20,15	20,13	20,06	20,12	0,049	0,245	100,58	0,266

FONTE: O AUTOR (2008)

Os valores de “p” para os conjuntos de dados referentes à concentração de 15 µg/mL em 305, 315 e 320 nm, na recuperação de AK em creme Lanette foram 0,560, 0,319 e 0,158 respectivamente, assumindo que as variâncias são iguais. Todos os valores são maiores que 0,05 e isto significa que não se deve rejeitar a hipótese nula e os valores são estatisticamente iguais aos “verdadeiros”.

Tabela 05 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE AK EM PRESENÇA DE HIDROQUINONA NO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO EM CREME LANETTE E ERRO RELATIVO

Conc. teórica (µg/ml)	λ (nm)	Concentração (µg/ml)			Média	DP	DPR	Recuperação (%)	Erro relativo (%)
10	305	18,97	18,97	19,00	18,98	0,019	0,099	189,81	0,121
	315	11,04	11,03	11,08	11,05	0,028	0,249	110,51	0,282
	320	10,33	10,33	10,40	10,35	0,045	0,434	102,02	0,491
15	305	27,49	27,49	27,48	27,49	0,002	0,005	183,24	0,006
	315	16,02	16,02	16,02	16,02	0,004	0,023	106,80	0,026
	320	15,01	15,02	15,02	15,02	0,005	0,031	100,10	0,035
20	305	36,58	36,56	36,56	36,57	0,012	0,033	182,84	0,037
	315	21,54	21,55	21,54	21,54	0,010	0,047	107,81	0,046
	320	20,32	20,34	20,42	20,36	0,056	0,277	101,80	0,313

FONTE: O AUTOR (2008)

Os valores de “p” para os conjuntos de dados referentes à concentração de 15 µg/mL em 305, 315 e 320 nm na recuperação de AK em presença de HQ em creme Lanette foram 0.000, 0.000 e 0.219 respectivamente quando se assumem variâncias iguais. Para os dois primeiros comprimentos de onda os valores de “p” são inferiores a 0,05 e isto significa que deve-se rejeitar a hipótese nula de que os conjuntos são iguais aos “verdadeiros”. Para 320 nm o valor é maior que 0,05, sendo considerado estatisticamente igual ao “verdadeiro”.

De acordo com os resultados da recuperação de AK em creme Lanette pode-se destacar, pela tabela 04, que quando ele é o único ativo não há interferência do creme lanette na quantificação do mesmo nas concentrações finais de 10, 15 e 20 µg/ml e nos comprimentos de onda de 305, 315 e 320 nm. A hidroquinona está presente em muitas formulações em associação com o AK na concentração de 4 e 2%, respectivamente. Nessa proporção, pelo ensaio de recuperação em lanette (tabela 05), pode-se verificar que nas concentrações finais de 10, 15 e 20 µg/ml e nos comprimentos de onda de 305, 315 há interferência superior a 5%, pois a hidroquinona ainda absorve um pouco até essa faixa. Já em 320 nm a interferência é insignificante, de modo que nesse comprimento de onda a quantificação do AK é possível, mesmo na presença de hidroquinona.

Os resultados da recuperação de AK em presença ou não de hidroquinona em creme não iônico encontram-se nas tabelas 06 e 07, respectivamente.

TABELA 06 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE AK NO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO EM CREME NÃO IÔNICO E ERRO RELATIVO

Conc. teórica (µg/ml)	λ (nm)	Concentração (µg/ml)			Média	DP	DPR	Recuperação (%)	Erro relativo (%)
10	305	10,13	9,84	9,85	9,94	0,165	1,657	101,53	1,874
	315	10,15	10,19	10,20	10,18	0,025	0,250	101,81	0,282
	320	10,17	10,22	10,24	10,21	0,034	0,328	102,10	0,371
15	305	14,44	14,38	14,38	14,36	0,033	0,228	95,75	0,258
	315	14,49	14,41	14,43	14,45	0,038	0,262	96,30	0,297
	320	14,58	14,49	14,53	14,53	0,048	0,331	96,90	0,374
20	305	19,16	19,11	19,14	19,13	0,025	0,131	95,67	0,148
	315	19,28	19,21	19,25	19,25	0,031	0,161	96,23	0,182
	320	19,39	19,31	19,34	19,35	0,040	0,206	96,74	0,233

FONTE: O AUTOR (2009)

Os valores de “p” para os conjuntos de dados referentes à concentração de 15 µg/mL em 305, 315 e 320 nm na recuperação de AK em creme não iônico foram 0,013, 0,018 e 0,039 respectivamente. Todos os valores são menores que 0,05 e isto significa que se deve rejeitar a hipótese nula e os valores não são estatisticamente iguais aos “verdadeiros”.

TABELA 07 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE AK EM PRESENÇA DE HIDROQUINONA NO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO EM CREME NÃO IÔNICO E ERRO RELATIVO

Conc. teórica (µg/ml)	λ (nm)	Concentração (µg/ml)			Média	DP	DPR	Recuperação (%)	Erro relativo (%)
10	305	19,06	18,49	18,49	18,68	0,329	1,762	190,83	1,994
	315	11,00	11,01	11,01	11,00	0,008	0,068	110,05	0,077
	320	10,22	10,24	10,24	10,23	0,013	0,128	102,34	0,113
15	305	26,53	26,51	26,51	26,52	0,010	0,039	176,78	0,044
	315	15,33	15,34	15,35	15,34	0,010	0,063	102,29	0,071
	320	14,51	14,56	14,48	14,51	0,009	0,065	96,76	0,073
20	305	35,52	35,54	35,53	35,53	0,010	0,029	177,67	0,032
	315	20,65	20,67	20,64	20,65	0,015	0,074	103,26	0,083
	320	19,26	19,32	19,27	19,28	0,031	0,158	96,42	0,180

FONTE: O AUTOR (2009)

Os valores de “p” para os conjuntos de dados referentes à concentração de 15 µg/mL em 305, 315 e 320 nm na recuperação de AK em presença de HQ em creme Lanette foram 0.000, 0.011 e 0.33 respectivamente. . Para os dois primeiros comprimentos de onda os valores de “p” são inferiores a 0,05 e isto significa que deve-se rejeitar a hipótese nula de que os conjuntos são iguais aos “verdadeiros”. Para 320 nm o valor é maior que 0,05, sendo considerado estatisticamente igual ao “verdadeiro”.

De acordo com os resultados da recuperação de AK pode-se destacar pela tabela 06, que quando ele é o único ativo o nível de interferência do creme não iônico na quantificação do mesmo nas concentrações finais de 10, 15 e 20 µg/ml e nos comprimentos de onda de 305, 315 e 320 nm está dentro do limite de 5%. Quando a hidroquinona está presente, pelo ensaio de recuperação em creme não iônico (tabela 07) pode-se verificar que nos comprimentos de onda de 305 e 315 há interferência superior a 5%, pois a hidroquinona ainda absorve um pouco até essa faixa. Já em 320 nm a interferência é menor que 5 %, de modo que nesse comprimento de onda a quantificação do AK é possível mesmo na presença de hidroquinona.

5.3.5 Robustez

A robustez é um ensaio que tem por objetivo verificar a capacidade do método em suportar pequenas variações em parâmetros do método de modo que os resultados continuem inalterados. Ele mede a confiabilidade do método em condições normais, permitindo verificar as tolerâncias dos parâmetros críticos do método. Neste caso foram avaliados o fator tempo, pH, temperatura e variação da concentração do metal.

Para determinação do erro do método também foram estimados componentes de variância associados às fontes de variação de cada particular método, considerando-se na especificação do erro relativo intervalos com 95% de confiança para média.

5.3.5.1 Influência do tempo de leitura na intensidade de absorção

O primeiro parâmetro analisado foi a influência do tempo sobre a estabilidade da solução e a intensidade de absorção. Uma solução de concentração conhecida foi preparada e lida no tempo zero, 24 h e 72 h após o preparo, sendo que as duas últimas foram mantidas em temperatura controlada de 20°C até leitura. Como pode ser observado, através da análise da tabela 08, não houve diferença significativa nos valores de absorbância do tempo zero até setenta e duas horas. A estabilidade do sistema faz com que a solução possa ser lida em espectrofotômetro até três dias

após o seu preparo. Deste modo o fator tempo não é um parâmetro crítico inerente ao método.

TABELA 08 – RESULTADO DO ENSAIO DE ROBUSTEZ PELA AVALIAÇÃO DO TEMPO

Tempo (h)	Concentração (µg/mL)	Absorbância média	Conc. média real (µg/mL)	Erro relativo (%)
0	15	0,547	14,72	0,121
24	15	0,551	14,84	0,214
72	15	0,536	14,43	0,262
	Média	0,545	14,66	
	DP	0,008	0,212	
	DPR	1,438	1,448	

FONTE: O AUTOR (2008)

Foi aplicado o test t para amostras pareadas na comparação entre os valores “verdadeiros” e os tempos zero, 24 e 72 h no ensaio de robustez para a avaliação da influência do tempo sobre a estabilidade do sistema e a intensidade de absorção referentes à concentração de 15 µg/mL. Os valores de “p” para os conjuntos de dados foram 0,185, 0,222 e 0,221, respectivamente. Todos os valores são maiores que 0,05 e isto significa que não se deve rejeitar a hipótese nula e os valores são estatisticamente iguais aos “verdadeiros”.

Também foi aplicado o teste ANOVA one way. O teste de homogeneidade de variâncias foi verificado pelo teste de Levene, sendo:

$H_0: s^2_1 = s^2_2 = s^2_3$; H_1 : As variâncias são homogêneas

Como pelo teste de Levene $F=1,545 < F_{(0.05;2;6)} = 5,14$, ou $p\text{-value} = 0.288 > \alpha=0.05$, conclui-se que as variâncias são homogêneas, isto é, dentro de cada um dos tratamentos a variabilidade é apenas devida a causas aleatórias. Por ANOVA $F= 3,325 < F_{(0.05;2;6)} = 5,14$, ou $p\text{-value} = 0.107 > \alpha=0.05$, conclui-se que não existem diferenças significativas entre os tempos zero, 24 e 72 h com um nível de significância de 5%. No teste de comparações múltiplas são identificados apenas um tratamento que se difere significativamente, que é entre o tempo zero e 72 h, mas apenas o teste LSD que acusa essas diferenças. Isto é, o teste LSD acusa como diferentes tratamentos cujas médias estão menos afastadas do que o teste Tuckey, que dá, por assim dizer, maior margem de dúvida antes de imputar essas diferenças aos efeitos dos tratamentos.

5.3.5.2 Influência da temperatura na intensidade de absorção

O segundo parâmetro avaliado foi a influência da temperatura sobre a estabilidade do sistema. Uma solução de concentração conhecida foi preparada e dividida em três porções, sendo que a primeira foi reservada em geladeira a 5°C, a segunda mantida em temperatura controlada a 20°C e a terceira em estufa a 30°C, todas mantidas nesses ambientes por quatro horas. Para essa faixa de temperatura não houve alteração significativa na leitura de absorbância, como pode ser visualizado na tabela 09. Pequenas variações para mais ou para menos não afetam o sistema e isso faz com que o fator temperatura não seja crítico ao método.

TABELA 09 – RESULTADO DO ENSAIO DE ROBUSTEZ PELA AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA

Temperatura (°C)	Concentração (µg/mL)	Absorbância média	Conc. média real (µg/mL)	Erro relativo (%)
5	15	0,5200	13,99	0,243
20	15	0,5214	14,03	0,262
30	15	0,5191	13,97	0,120
	Média	0,5202	13,99	
	DP	0,001159	0,03141	
	DPR	0,2227	0,2244	

FONTE: O AUTOR (2008)

Foi aplicado o test t para amostras pareadas na comparação entre os valores “verdadeiros” e as temperaturas 5°C, 20°C e 30°C no ensaio de robustez para a avaliação da influência da temperatura sobre a estabilidade do sistema e a intensidade de absorção referentes à concentração de 15 µg/mL. Os valores de “p” para os conjuntos de dados foram 0.357, 0.221 e 0.369, respectivamente. Todos os valores são maiores que 0,05 e isto significa que não se deve rejeitar a hipótese nula e os valores são estatisticamente iguais aos “verdadeiros”.

Também foi aplicado o teste ANOVA one way. O teste de homogeneidade de variâncias foi verificado pelo teste de Levene, sendo:

$$H_0: s^2_1 = s^2_2 = s^2_3$$

H_1 : As variâncias são homogêneas

Como pelo teste de Levene $F=1,980 < F_{(0.05;2;6)} = 5,14$, ou $p\text{-value} = 0,219 > z'\alpha = 0.05$, conclui-se que as variâncias são homogêneas, isto é, dentro de cada um dos tratamentos a variabilidade é apenas devida a causas aleatórias. Por ANOVA

$F = 1,030 < F_{(0,05;2;6)} = 5,14$, ou $p\text{-value} = 0,415 > \alpha = 0,05$, conclui-se que não existem diferenças significativas entre as temperaturas 5, 20 e 30°C com um nível de significância de 5%.

No teste de comparações múltiplas não são identificados nenhum tratamento que se difere significativamente.

5.3.5.3 Influência do pH na intensidade de absorção

O terceiro parâmetro avaliado foi a influência do pH sobre a estabilidade do sistema. Foram preparadas nove soluções de concentração conhecida e o pH de cada uma foi ajustada com hidróxido de potássio. O pH da solução obtida diretamente do método é igual a 1 e através da avaliação dos dados obtidos pela variação do pH pode-se verificar que o intervalo de 1 a 3 é o que deve ser utilizado para a quantificação do AK. O pH 4, apesar do valor ser muito próximo aos outros, não se recomenda que seja utilizado uma vez que a solução resultante é levemente turva. Entre pH 5 e 8 houve a formação de um precipitado floculado que se dissolia facilmente. Pela análise do material límpido sobrenadante é possível gerar a hipótese de que nessa faixa de pH em que o alumínio precipita pode ter carregado quase todo o AK ainda na forma de complexo, pois se o analito estivesse livre na solução a absorbância deveria ser maior que a verificada. Em pH 11 a solução volta a ficar límpida, entretanto o rearranjo eletrônico no meio básico é diferente do ácido, gerando picos de absorbância em $\lambda(\text{nm})$ diferente de 305 nm como na faixa ácida. Em pH 14 a solução voltou a ficar turva.

TABELA 10 – RESULTADO DO ENSAIO DA ROBUSTEZ PELA AVALIAÇÃO DO pH

pH	Concentração teórica ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbância média	Concentração real ($\mu\text{g/ml}$)	DP	DPR	p
1	15	0,541	14,648	0,0157	0,1071	0,185
2	15	0,532	14,399	0,0094	0,0654	0,051
3	15	0,531	14,392	0,0097	0,0676	0,052
4	15	0,540	14,636	0,0224	0,1530	0,167
5	15	0,110	2,980	0,0450	1,5096	0,000
7	15	0,015	0,412	0,0952	23,1094	0,000
8	15	0,076	2,047	0,1128	5,5121	0,000
11	15	0,339	9,198	0,0379	0,4125	0,000
14	15	0,650	17,611	0,0294	0,1667	0,002

FONTE: O AUTOR (2008)

Foi aplicado o test t para amostras pareadas na comparação entre os valores “verdadeiros” e os valores de pH no ensaio de robustez para a avaliação da influência do pH sobre a estabilidade do sistema e a intensidade de absorção referentes à concentração de 15 µg/mL. Os valores de “p” para os conjuntos de dados de pH 1 a 4 foram maiores que 0,05 e isto significa que não se deve rejeitar a hipótese nula e os valores são estatisticamente iguais aos “verdadeiros”. Do pH 5 ao 14 os valores são inferiores a 0,05, ou seja, são estatisticamente diferentes.

Também foi aplicado o teste ANOVA one way. O teste de homogeneidade de variâncias foi verificado pelo teste de Levene, sendo:

$$H_0: s^2_1 = s^2_2 = s^2_3$$

H_1 : As variâncias são homogêneas

Como pelo teste de Levene $F = 3,524 > F_{(0.05;8;18)} = 2,510$, ou $p\text{-value} = 0,013 < \alpha = 0.05$, conclui-se que as variâncias não são homogêneas, isto é, dentro de cada um dos tratamentos a variabilidade não se dá apenas devido a causas aleatórias. Por ANOVA $F = 44157 > F_{(0.05;8;18)} = 2,510$, ou $p\text{-value} = 0,000 < \alpha = 0.05$, conclui-se que existem diferenças significativas entre os valores de pH com um nível de significância de 5%.

No teste de comparações múltiplas são identificados em todos os tratamentos que se diferem significativamente, exceto entre o pH 1 e 4 e entre pH 2 e 3.

O pH é um fator crítico que deve ser verificado para que não se tenha soluções de pH superiores a 3.

5.3.5.4 Influência da concentração do metal na intensidade de absorção

Este ensaio foi verificado numa das primeiras etapas do processo analítico (figura 30 – página 77) e por ele nota-se que na proporção próxima de 1:1 em diante até a relação em que se tem excesso de alumínio com AK 1 : 136 Al^{3+} não há mais diferença estatística entre os valores de absorbância obtidos. Deve-se garantir que sempre se tenha alumínio em excesso de até 136 vezes mais para se ter uma intensidade de leitura máxima e constante, pois esse é um fator crítico ao processo.

5.4 ESTUDO DO COMPLEXO

Para confirmar como ocorrem as coordenações (AK-Al³⁺) e quais grupos da molécula do AK estariam envolvidos na complexação do mesmo com o alumínio foram feitos ensaios por espectroscopia no infravermelho e de ressonância magnética nuclear de ¹³C com base nas espécies encontradas nas titulações potenciométricas e nos diagramas de especiação, de acordo com a variação do pH.

5.4.1 Titulação potenciométrica e espectroscopia no ultravioleta

É importante caracterizar o tipo do complexo e a porcentagem em que cada tipo aparece à medida que se varia o pH. Uma das técnicas utilizadas para caracterizar as espécies formadas no sistema é através da titulação potenciométrica. Os complexos metálicos do AK têm uma estabilidade relativa alta (BHATIA; KAUSHIK; SODHI, 1988).

A determinação das constantes de estabilidade por titulação potenciométrica é uma maneira poderosa para se definir a identidade e distribuição de complexos ligante-metal e conseqüentemente para se proceder a investigação da especiação em sistemas aquosos (JORDAN *et al.*, 1996). É uma técnica comum, pela simplicidade do instrumento e da automação.

O objetivo da utilização da técnica de titulação potenciométrica, neste trabalho, foi inicialmente determinar a constante de protonação do AK e as constantes de complexação do sistema aquoso AK na presença de íons alumínio, de acordo com a variação de pH. Dados da literatura, de estudos anteriores sobre AK não complexado e complexado à alumínio foram relatados em 2001 (MARTELL, A. E.; SMITH, R. M. 2001) e mostraram valores para $\log K = 7.66 \pm 0.05$ (25°C e I = 0,1 mol/L) e $\log K$ para os complexos metal-ligante $ML = 7.66$ (25°C e I = 0,1 mol/L), e $\log \beta$ para ML_2 e $ML_3 = 13,72$ e $19,26$ (25°C e I = 0,5 mol/L).

Os dados encontrados por (SALLAM; HAGGAG; MASOUD, 1990) em meio aquoso também indicam que apenas um próton é liberado entre $\alpha = 0 - 1$ (α = mols de base adicionada por mol de ligante). O valor obtido da constante de protonação (7,68) para o equilíbrio protolítico envolvendo as espécies neutras e aniônicas estão de acordo com os reportados na literatura de 7,75, 7,83, 7,61 e 7,80 (SALLAM;

HAGGAG; MASOUD, 1990). Outro pKa encontrado na literatura por HEDLUNT; OHMAN (1988) foi de 7,61.

A titulação potenciométrica do ácido kójico foi também realizada por MURAKAMI (1962) e forneceu somente uma inflexão nítida (porém o artigo não mostra a curva da titulação potenciométrica), a qual corresponde à dissociação que pode ser visualizada na figura 36.

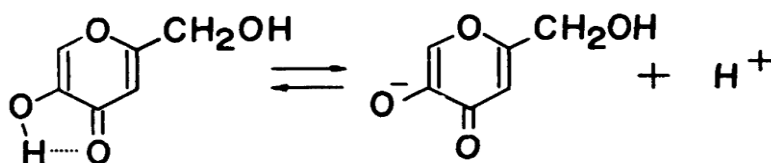


FIGURA 36 – REPRESENTAÇÃO DA DISSOCIAÇÃO DO ÁCIDO KÓJICO
FONTE - MURAKAMI (1962)

O valor de log K relatado (MURAKAMI, 1962) foi de 7,68. O mesmo autor sugere a formação de um complexo tetracoordenado com o íon magnésio (II), conforme figura 37. O íon magnésio (II) tem um comportamento parecido com o íon manganês (II), com similar magnitude na formação das constantes em sistema aquoso.

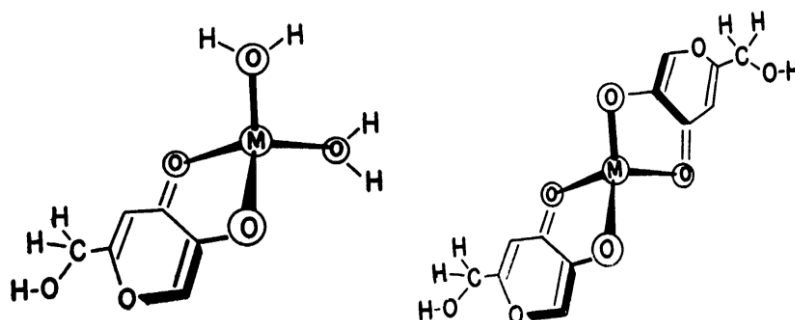


FIGURA 37 - ESTRUTURAS DA COORDENAÇÃO DO AK COM MAGNÉSIO
FONTE: MURAKAMI (1962)

Inicialmente, de posse das constantes de protonação do ligante procedeu-se aos cálculos das constantes de complexação do ligante mais o íon metálico em estudo. Os cálculos com os dados potenciométricos da titulação do AK na ausência do alumínio forneceu uma desprotonação, com $pK_a = 7,68 \pm 0,02$ (25,0°C, $I = 0,100$ mol/L KCl), valor em conformidade com os outros relatados na literatura. A desprotonação ocorre pela perda do hidrogênio ligado ao oxigênio do carbono 5, que pode ser visualizado na figura 43. Na figura 38 visualiza-se a curva de titulação

experimental (linha grossa formada pela união de pequenos quadrados) e simulada (linha fina) para o AK puro, curva esta que é feita a partir do teste estatístico do *qui* quadrado e contando com 95% de confiança.

Com os dados das titulações potenciométricas para AK (0,1 mmol) + Al^{3+} (10 mL) (proporção ligante-metal 1:1), AK (0,1 mmol) + Al^{3+} (5 mL) (proporção ligante-metal 1:0,5) e AK (0,1 mmol) + Al^{3+} (3 mL) (proporção ligante-metal 1:0,3), calculou-se – utilizando o programa HYPERQUAD (GANS; SABATINI; VACCA 1993) – em cada um desses três experimentos feitos em triplicata, para se obter as constantes de complexação de cada um dos sistemas nas proporções estudadas. Os cálculos, utilizando-se este programa com o método matemático de mínimos quadrados, são feitos utilizando-se os valores obtidos inicialmente por suposições químicas e matemáticas e recalculados.

A cada nova etapa de cálculo, as curvas de simulação matemática e experimental são checadas e quando a maior sobreposição for atingida e o erro não diminuir mais, dá-se por terminado os cálculos. Tendo-se procedido assim com a matriz matemática composta de concentração das espécies conhecidas, expressas em milimol, constantes de hidrólise do alumínio (BAES E MESMER, 1976), log K_a do AK e possíveis espécies complexas do sistema $\text{AK}:\text{Al}^{3+}$, obteve-se as constantes de complexação que estão dispostas na tabela 12. A figura 48 mostra os perfis das titulações potenciométricas do $\text{AK} + \text{Al}^{3+}$ nas proporções 1:1, 1: 0,5 e 1:0,3, ligante-metal.

Através da curva da titulação potenciométrica do ácido kójico não complexado (figura 38) pode-se observar que até pH 11 existe uma inflexão nítida e uma segunda discutível. Dá-se o nome de ponto de inflexão ao ponto que separa uma parte convexa de uma curva contínua de uma parte côncava, ou seja, a inflexão é uma indefinição transitória das tendências da função em um determinado ponto no qual ela passa da condição de tendência ao crescimento para a tendência ao decaimento, ou vice-versa.

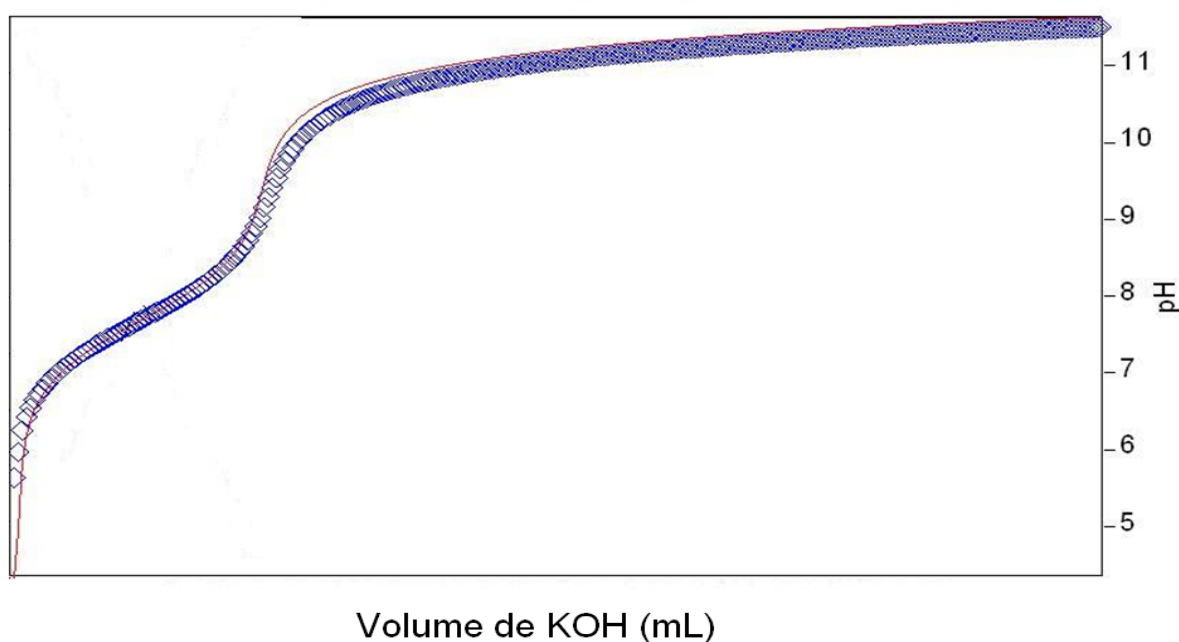


FIGURA 38 - CURVA DE TITULAÇÃO DO ÁCIDO KÓJICO NÃO COMPLEXADO (SOLUÇÃO AQUOSA 0,1mmol)
 FONTE: O AUTOR (2009)

As soluções tiveram seus valores de pH aumentados e os espectros foram obtidos nestas soluções de razão e pHs variados. Durante a conversão química de uma espécie em outras, absorventes no UV e/ou visível, os espectros se cruzarão no mesmo comprimento de onda, cruzamento conhecido como ponto isobéstico (HARRIS, 2001). Dois pontos isobésticos (ponto onde as curvas se juntam e comprimento de onda da forma ácida e básica tem o mesmo coeficiente de extinção e índices de absorbância iguais) aparecem no espectro ácido kójico não complexado (figura 39). Um deles corresponde à desprotonação e o segundo corresponde possivelmente a uma interconversão de espécie hidrolisada, não determinada neste estudo.

Através do espectro no UV do AK (figura 40) tem-se que na região próxima ao comprimento de onda 270 nm pode-se observar que do pH 2,0 até 6,0 tem-se espectros praticamente idênticos, já em 6,5 há um decréscimo discreto que continua em 7,0 e em 7,5 é significativo (desprotonação de AKH para AK^-). A queda persiste até estabilidade a partir de 9,5 até 12, já com total inversão da banda no espectro de 270 nm para 315 nm (figura 41).

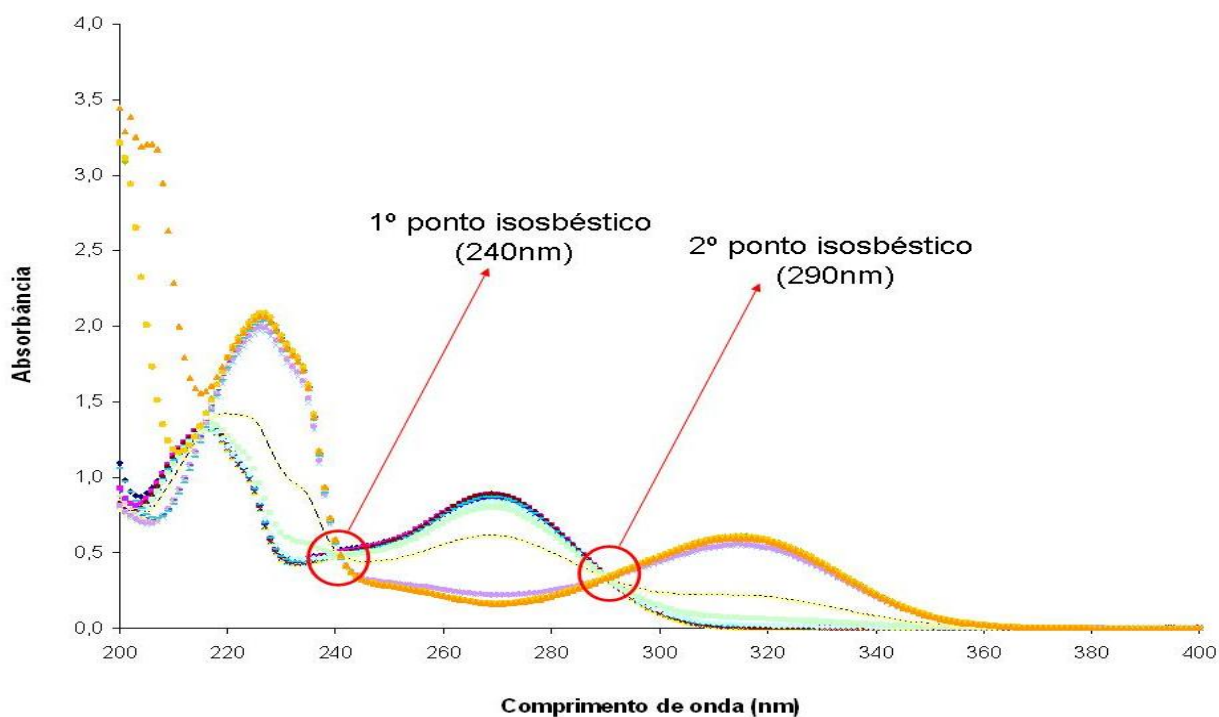


FIGURA 39 – ESPECTROS DE UV DO ÁCIDO KÓJICO NÃO COMPLEXADO EM SOLUÇÃO AQUOSA (15µg/mL) NA VARIAÇÃO DE pH DE 2,0 A 12,0 E IDENTIFICAÇÃO DOS DOIS PONTOS ISOSBÉSTICOS
 FONTE: O AUTOR (2009)

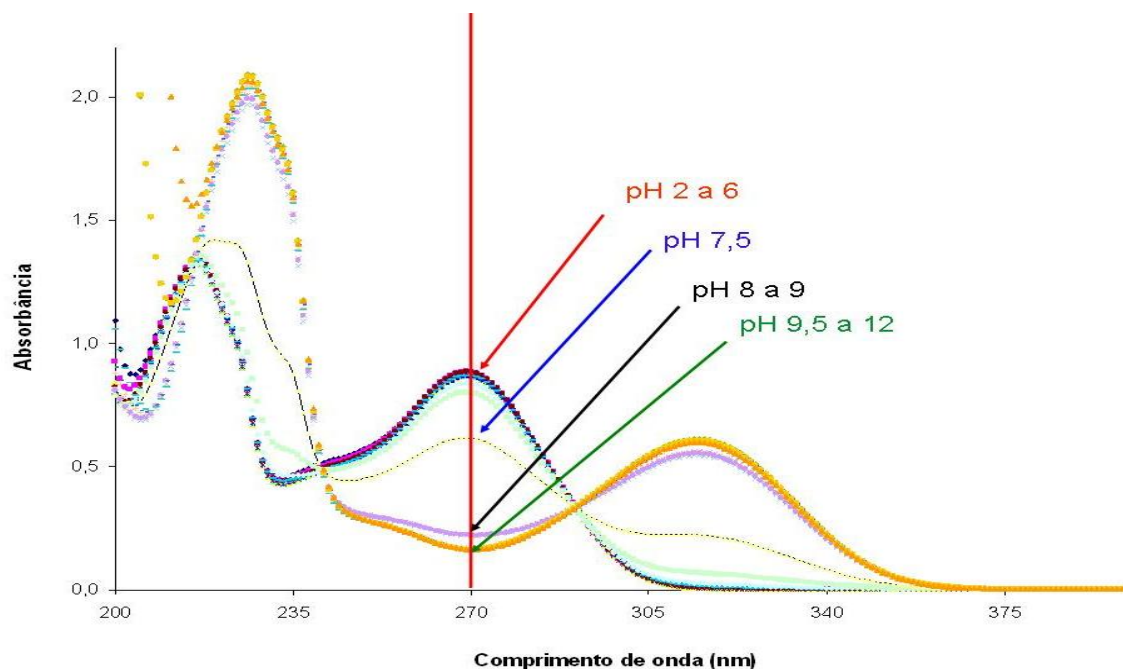


FIGURA 40 – ESPECTROS DE UV DO ÁCIDO KÓJICO NÃO COMPLEXADO EM SOLUÇÃO AQUOSA (15µg/mL) NA VARIAÇÃO DE pH DE 2,0 A 12,0 E IDENTIFICAÇÃO DOS pH NO $\lambda = 270$ nm, DEPOIS DO PRIMEIRO PONTO ISOSBÉSTICO
 FONTE: O AUTOR (2009)

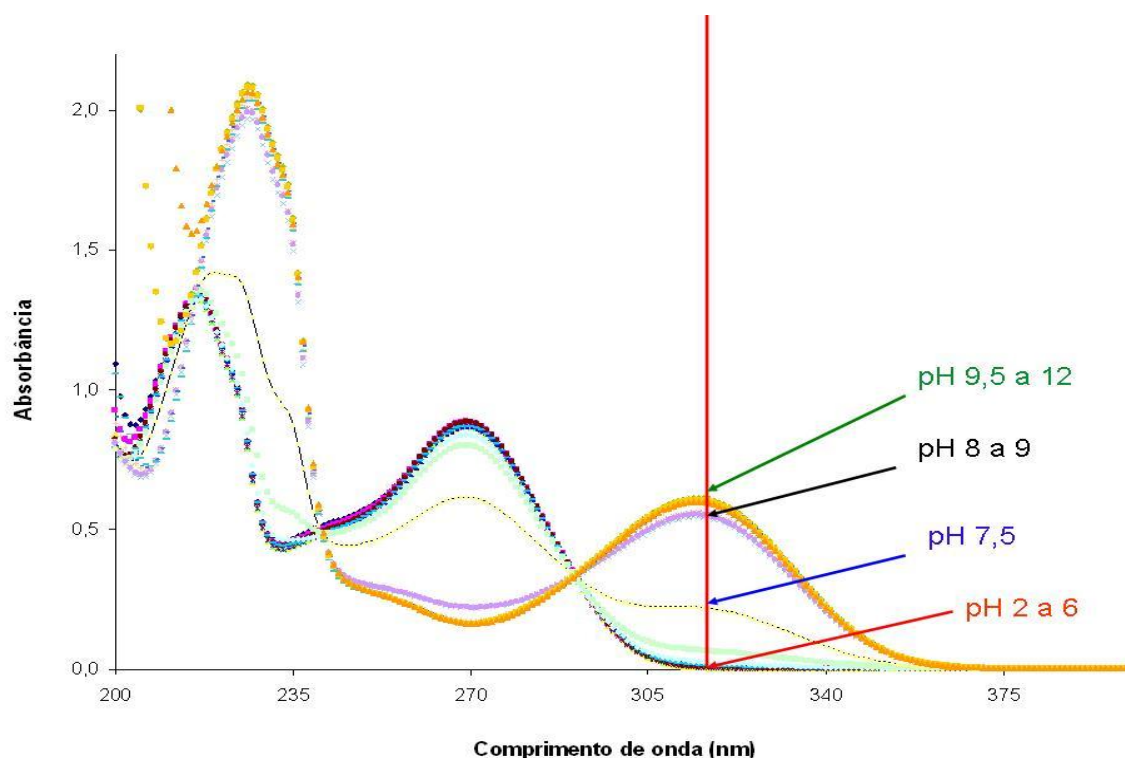


FIGURA 41 - ESPECTRO DE UV DO ÁCIDO KÓJICO NÃO COMPLEXADO EM SOLUÇÃO AQUOSA (15µg/mL) NA VARIAÇÃO DE pH DE 2,0 A 12,0 E IDENTIFICAÇÃO DOS pH NO $\lambda = 315$ nm, DEPOIS DO SEGUNDO PONTO ISOSBÉTICO.
FONTE: O AUTOR (2009)

A existência de dois pontos isosbéticos aumentaram ainda mais a dúvida sobre a possível segunda inflexão do AK, que corresponderia à segunda ionização do mesmo ainda não relatada na literatura. Para confirmar essa possibilidade foram calculadas as derivadas dos dados da variação do pH em função da adição de base. Os possíveis pontos de inflexão são aqueles que separam uma parte convexa de uma curva contínua de uma parte côncava e quando existe derivada segunda nos pontos de inflexão, ela é nula. Através desse cálculo verificou-se que existe apenas um único ponto em que a segunda derivada é nula na variação máxima dos dois eixos (figura 42).

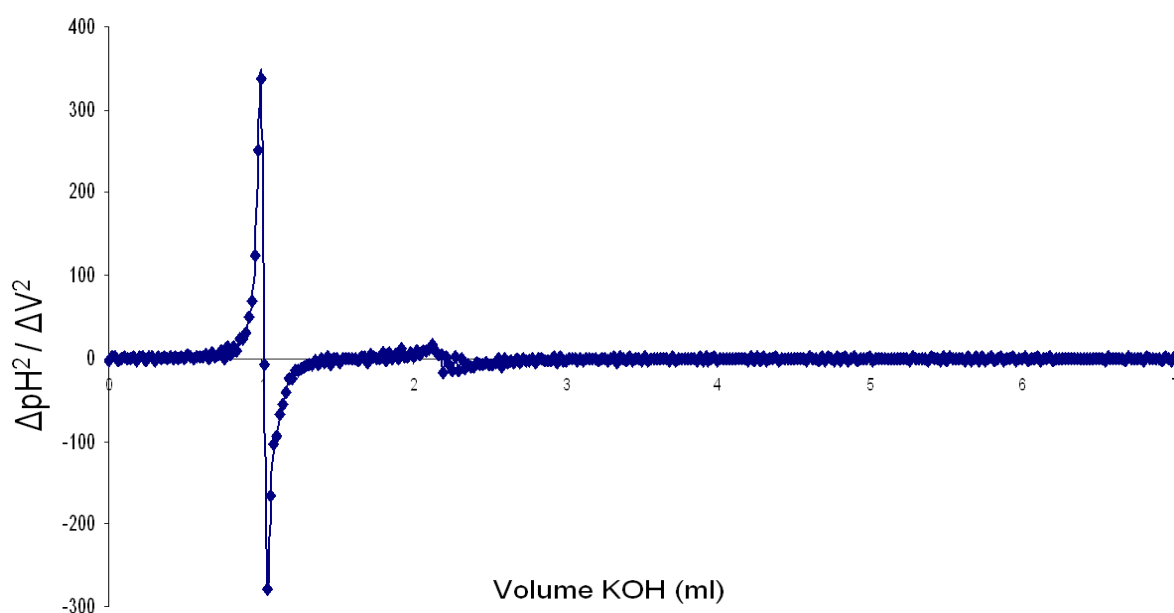


FIGURA 42 – GRÁFICO DA SEGUNDA DERIVADA DA TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DO AK NÃO COMPLEXADO
 FONTE: O AUTOR (2009)

Deste modo, concluiu-se que na titulação potenciométrica do AK há apenas uma inflexão e dados posteriores descritos a seguir, envolvendo outras técnicas analíticas, demonstraram que somente há a perda do hidrogênio ligado ao oxigênio do carbono 5 (figura 43).

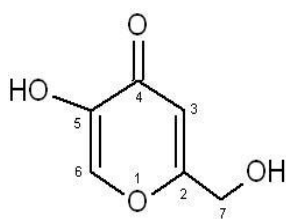


FIGURA 43 - ESTRUTURA DO ÁCIDO KÓJICO COM OS CARBONOS ASSINALADOS
 FONTE: O AUTOR (2009)

Com base no modelo de apenas uma ionização e de posse dos valores da titulação e das constantes calculadas, o programa HYSS (ALDERIGHI *et al.*, 1999) calculou e desenhou o diagrama de distribuição das espécies para o sistema do AK não complexado como pode ser visualizado na figura 44.

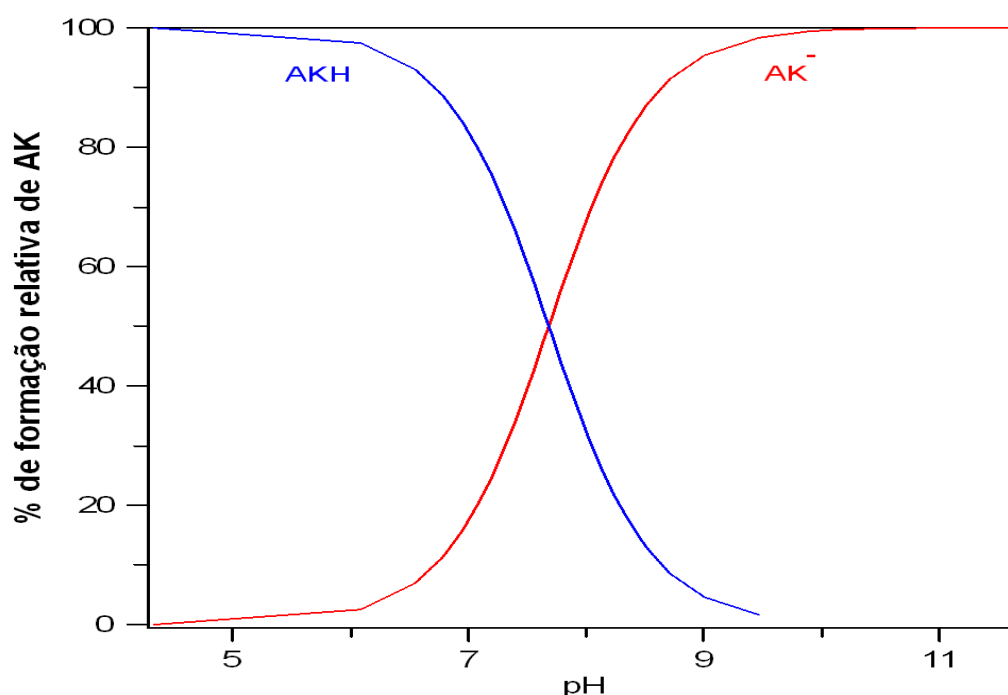


FIGURA 44 - DIAGRAMA DE ESPECIAÇÃO DO AK NÃO COMPLEXADO EM MEIO AQUOSO
 FONTE: O AUTOR (2010)

Foram realizados, na seqüência, ensaios para várias proporções de metal-ligante seguindo o mesmo raciocínio dos cálculos. A curva da titulação potenciométrica da proporção AK 1:1 Al^{3+} está representada na figura 45.

As titulações, na presença de alumínio, apresentam uma região de tamponamento grande, pois a solução de cloreto de alumínio utilizada, acidificada, necessita de um grande volume de base para neutralizar esse ácido inorgânico. Um número maior de inflexões observado sugere a presença de um número grande de espécies complexadas presentes. Estas espécies sugeridas pela titulação potenciométrica (tabela 12), podem ser visualizadas através do maior número de pontos isobésticos (figura 46) no espectro no UV e também observadas nos diagrama de distribuição das espécies, figura 47.

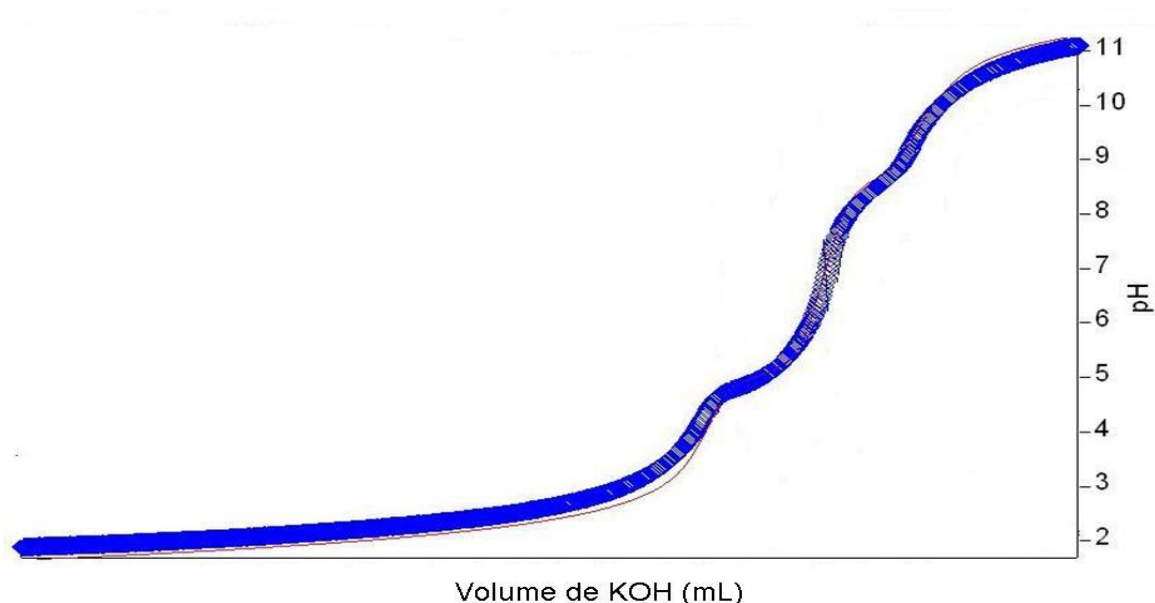


FIGURA 45 - CURVA DE TITULAÇÃO NA PROPORÇÃO AK 1:1 ALUMÍNIO EM MEIO AQUOSO
FONTE: O AUTOR (2009)

As espécies complexadas e hidrolíticas de Al^{3+} estão representadas como: metal = Al^{3+} ; ligante ácido kójico = L; n prótons = H_n e n OH^- = H_{-n} . Os sistemas aquosos de alumínio apresentam normalmente varias espécies complexadas que podem ou não ser solúveis em água, dependendo sempre do ligante e do valor de pH que se está considerando.

De acordo com a literatura até 2001 (MARTELL, A. E.; SMITH, R. M. 2001) que é uma compilação de dados da literatura, há 3 constantes de complexação, do tipo metal ligante, detectadas nos estudos efetuados até então, ML , ML_2 e ML_3 . No entanto, estudos anteriores mostram que o AK na presença de Al^{3+} forma espécies complexas tanto n protonadas como n hidroxiladas (HEDLUNT; OHMAN, 1988). Portanto sistemas aquosos que contem AK + Al^{3+} em diferentes proporções M e L e em pH variáveis, são sistemas interessantes e ricos para estudos continuados.

À medida que os sistemas analíticos se aproximam em sensibilidade e limite de detecção, mais espécies são possíveis de serem detectadas, tornando o desafio de encontrar essas espécies e de calcular suas constantes de complexação, maior.

A lista de valores de K_a de complexação, conforme tabela 12, maior que os valores relatados até 2010 na literatura, pode não ser ainda exaustiva, nem a final, pois o sistema $\text{AK} + \text{Al}^{3+}$ em água é rico em espécies complexadas e que a solubilidade dessas espécies é em função do pH.

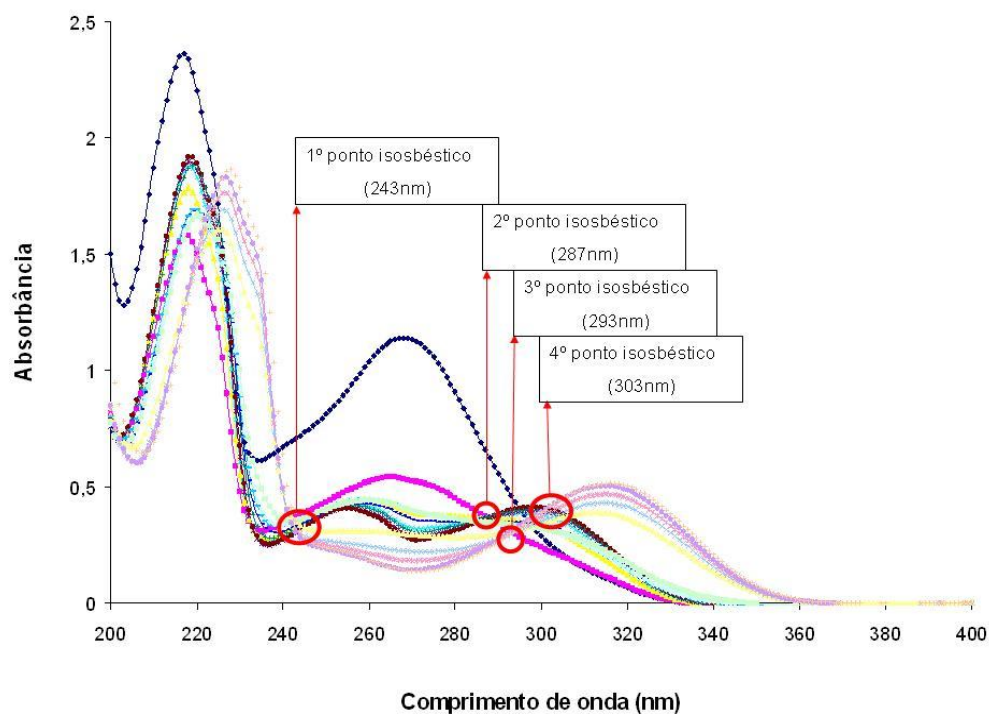


FIGURA 46 - ESPECTROS DE UV DO ÁCIDO KÓJICO 1:1 ALUMÍNIO EM SOLUÇÃO AQUOSA (15µg/mL) NA VARIAÇÃO DE pH DE 2,0 A 12,0 E IDENTIFICAÇÃO DOS PONTOS ISÓSBÉTICOS
FONTE: O AUTOR (2009)

Os espectros obtidos no UV-Vis, contendo vários pontos isobésticos confirmam a variedade de espécies complexadas nos sistemas estudados e calculados anteriormente.

De posse dos valores das constantes calculadas, o programa HYSS (ALDERIGHI *et al.*, 1999) calculou e desenhou o diagrama de distribuição das espécies para cada um dos sistemas estudados. Cada um dos sistemas contendo diferentes proporções de AK e Al^{3+} foi estudado pela técnica de espectroscopia no UV para se tentar mapear a presença das espécies propostas pela técnica da titulação potenciométrica (figura 47).

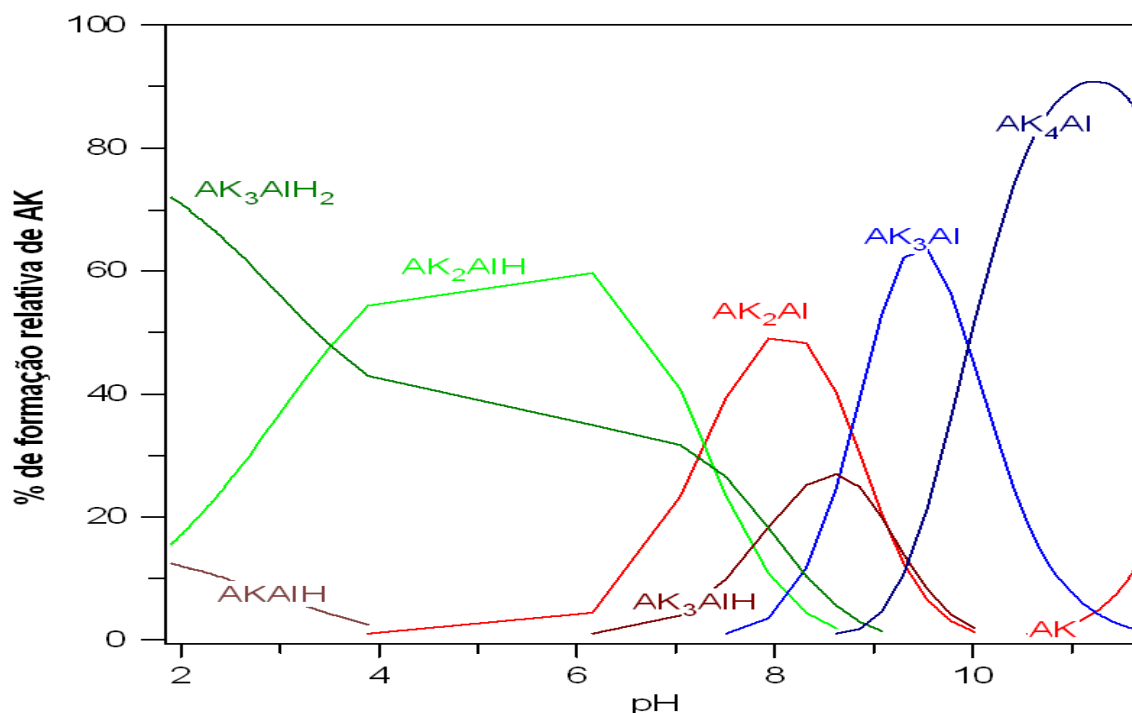


FIGURA 47 - DIAGRAMA DE ESPECIAÇÃO DA PROPORÇÃO AK 1:1 Al³⁺
 FONTE: O AUTOR (2010)

Espécies hidrolíticas complexadas, AK desprotonado não complexado, espécies poliméricas do ligante não hidrolíticas e hidrolíticas estão presentes em toda a faixa de pH estudado, tanto para a proporção 1:1 como 1:0,5.

Os valores de pH em que há maior concentração de espécies complexadas solúveis é entre pH 6 e 10. Somente espécies solúveis e presentes em concentração acima de 10% em relação a todas as espécies metálicas presentes no equilíbrio foram consideradas para o cálculo dos diagramas de distribuição das espécies. Foi possível verificar através da figura 45 que o alumínio forma uma enormidade de espécies complexadas com o ligante estudado e a concentração e solubilidade delas são função da concentração dos reagentes e do pH considerado. As curvas de titulação do AK puro e na presença de alumínio, em duas proporções estudadas podem ser visualizados na figura 48. A proporção estudada Ligante 1:0,3 Metal não apresentou diferença nas espécies complexadas em relação às outras duas estudadas, e por isso não será discutida neste trabalho.

No estudo realizado por STENSON *et al* (2007) foi concluído que o ácido kójico forma prontamente complexos com 11 íons metálicos testados com três cargas positivas. Os complexos mais comuns encontrados foram ML₃H⁺ e M₂L₅. No caso do complexo com alumínio foram obtidos com maior abundância relativa a íons

correspondentes ao $(ML_2)^+$, $(ML_3H^+)^+$, $(M_2L_5)^+$ e $(M_2L_4OH^-)^+$ em que L representa o ácido kójico desprotonado (ou AK^-) e M o íon metálico $3+$. A energia de colisão necessária para dissociação do $(ML_2)^+$ com alumínio foi a maior entre os 11 elementos testados (Al, As, Cr, Ga, Fe, In, Yb, Y, Gd, Nd e La) e não por acaso ele é o elemento de menor número atômico e menor camada de valência, indicando que a ligação com o alumínio é a mais forte, pois necessita de uma energia de colisão maior.

As diferenças entre os espectros obtidos por UV da solução de ácido kójico puro e da solução AK 1:1 Al podem ser visualizadas nos comprimentos de onda máximos e intensidades do pH 2 até 11,5, conforme a tabela 11.

TABELA 11. COMPARAÇÃO ENTRE AS SOLUÇÕES DE AK PURO E COMPLEXADO COM ALUMÍNIO PARA OS VALORES DE ABSORBÂNCIA EM COMPRIMENTOS DE ONDA E DIFERENTES VALORES DE pH

AK não complexado			AK 1:1 Al ³⁺		
pH	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Abs.	pH	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Abs.
2,0	216 269	1,347 0,876	2,0	217 268	2,341 1,140
2,5	216 269	1,357 0,886	2,5	218 265	1,584 0,542
3,0	216 269	1,325 0,869	3,0	218 259	1,786 0,449
3,5	216 269	1,322 0,868	3,5	218 256 296	1,870 0,425 0,386
4,0	216 269	1,333 0,874	4,0	218 255 294	1,898 0,411 0,394
4,5	216 269	1,355 0,887	4,5	219 255 295	1,920 0,407 0,408
5,0	216 269	1,337 0,867	5,0	219 255 297	1,893 0,426 0,402
5,5	216 269	1,329 0,861			
6,0	216 269	1,340 0,871	6,0	220 258	1,691 0,428
6,5	217 269	1,325 0,839			
7,0	217 269	1,357 0,801	7,0	220 259	1,695 0,450
7,5	220 269	1,419 0,616	7,7	220 260	1,668 0,449
8,0	226 315	1,970 0,546			
8,5	226 315	2,005 0,560	8,5	220 260	1,666 0,442
9,0	226 315	1,993 0,553			

9,5	226 315	2,042 0,592	9,5	226 313	1,614 0,390
10,0	226 315	2,056 0,601	10,0	227 314	1,688 0,432
10,5	226 315	2,034 0,593	10,5	227 315	1,766 0,469
11,0	226 315	2,092 0,613	11,0	227 315	1,832 0,503
11,5	226 315	2,082 0,607	11,5	228 315	1,861 0,517
Pontos isosbéticos	$\lambda = 240$ e 290nm		Pontos isosbéticos	$\lambda = 243, 287, 293$ e 303nm	

FONTE: O AUTOR (2009)

TABELA 12 - CONSTANTES ÁCIDO KÓJICO EM MEIO AQUOSO EM VÁRIAS PROPORÇÕES MOLARES NA PESENGA DE ALUMÍNIO ($25,0^\circ\text{C}$ E $I = 0.100\text{ mol/L}$)

Espécies	AK não complexado	Al : AK
	Log β	
Al H ₁		-5.4091
Al H ₂		-9.9816
Al H ₃		-15.6916
Al H ₄		-23.4551
Al ₂ H ₂		-7.7
Al ₂ H ₃		-9.5742
Al ₃ H ₄		-13.6944
Al ₃ H ₁₁		-54.694
Al ₆ H ₁₅		-49.398
Al ₈ H ₂₂		-76.425
AK H	7,842	7,842
AK Al		14,7147
AK Al H		19,8244
AK Al ₂		19,3613
AK ₂ Al		25,8912
AK ₂ Al H		33,9850
AK ₂ Al H ₂		39,5787
AK ₃ Al		32,5274
AK ₃ Al H		45,1462
AK ₃ Al H ₂		52,6295
AK ₄ Al		44,2361
AK ₄ Al H ₄		77,1048
AK ₅ Al		52,7751
AK ₅ Al H		61,2327
AK ₇ Al		67,9809
H ₁	-13.78	-13.78

FONTE: O AUTOR (2010)

De acordo com os resultados obtidos (tabela 11) pode-se observar que em relação ao AK puro: de pH 2,0 a 6,0 o $\lambda_{\text{máx}}$ das duas bandas são os mesmos (216

nm) e as intensidades também (1,33); de pH 6,0 para 6,5 há deslocamento batocrômico da primeira banda de 216 nm para 217 nm, em pH 7,2, para 220 nm, e, em pH 8,0, também com deslocamento batocrômico pequeno para 226 nm e hiperocrômico na intensidade de 1,419 em pH 7,5 (220 nm) para 1,970 (226 nm); na segunda banda (269 nm) o deslocamento batocrômico é bem mais significativo de 269 nm (pH 7,5) para 315 (pH 8,0).

Pode-se observar que em relação ao sistema AK 1:1 Al (tabela 11), em pH 2,0 o AK está majoritariamente na forma protonada e as bandas em 217 nm e 268 nm são muito características, já em pH 2,5 há uma diminuição significativa da intensidade de absorção com deformação das bandas, fato esse que associado ao diagrama de especiação calculado pode-se sugerir que o alumínio já teria força suficiente para deslocar e ocupar o lugar do hidrogênio na ligação com o AK formando a primeira espécie complexada (AKAlH – MLH, onde $M = Al^{3+}$, $L = AK$); em pH 3,0 as bandas continuam deformadas e já de pH 3,5 a 5,0 voltam a ficar bem definidas, e desta vez são três bandas e não duas como abaixo de 3,5 e acima de 5,0; de pH 6,0 até 8,5 as bandas não estão bem definidas, sendo intermediárias ao formato das resultantes de pHs mais ácidos e mais básicos. A primeira banda característica (217 nm) em todos os pHs estão próximos a 220 nm e depois se desloca para 227 nm; a partir do pH 9,5 a segunda banda (269 nm) começa a se caracterizar melhor até ficar bem evidente em pH 11,5; de pH 2,0 a 5,0 a segunda banda se inicia em 268 nm e vai sofrendo um deslocamento hipsocrômico até 255 nm (poderia ser em função da maior solvatação do par de elétrons n não-ligados, o que abaixa a energia do orbital n . Em solvente polares hidroxilados, como água ou álcoois, a formação de ligações de hidrogênio entre prótons do solvente e o par de elétrons não-ligados é extensiva. Aqui a energia dos orbitais n é reduzida por uma grandeza aproximadamente igual à energia de ligação de hidrogênio. Quando uma transição $n \rightarrow \pi^*$ ocorre, no entanto, o elétron n remanescente não consegue manter a ligação de hidrogênio, assim, a energia do estado excitado n, π^* não é efetuada por esse tipo de interação com o solvente. Um deslocamento hipsocrômico corresponde, de modo geral, à energia de ligação de hidrogênio, aumentando até 260 nm em pH 8,5 com um salto até 313 nm em pH 9,5 e tendência de estabilização de pH 10,5 a 11,5 com 315 nm; a partir de pH 9,5 não se tem mais dados que confirmem a manutenção da complexação, induzindo à conclusão que a partir deste ponto ela seja mínima e decrescente (LEVER, 1964)

Os mesmos resultados mostram as correlações entre AK puro e o sistema AK 1:1 Al: no AK puro a primeira banda se estabiliza com absorção máxima em 226 nm no pH 8,0, enquanto que no outro sistema ela só chega ao mesmo λ em 9,5 e mesmo assim continua aumentando com o aumento do pH; com o analito puro a segunda banda se estabiliza com absorção máxima em 315 nm no pH 8,0, enquanto que com alumínio a partir de pH 10,5; apenas em alguns pHs são verificados comprimentos de onda máximo coincidentes, como em pH 7,5 (220 nm), 9,5 (226 nm) e de 10,5 a 11,5 (315nm); no pH 2,0 as duas bandas de absorção máxima são muito próximas (216 e 217, 269 e 268 nm) e de 2,5 até 7,5 são bem diferentes.

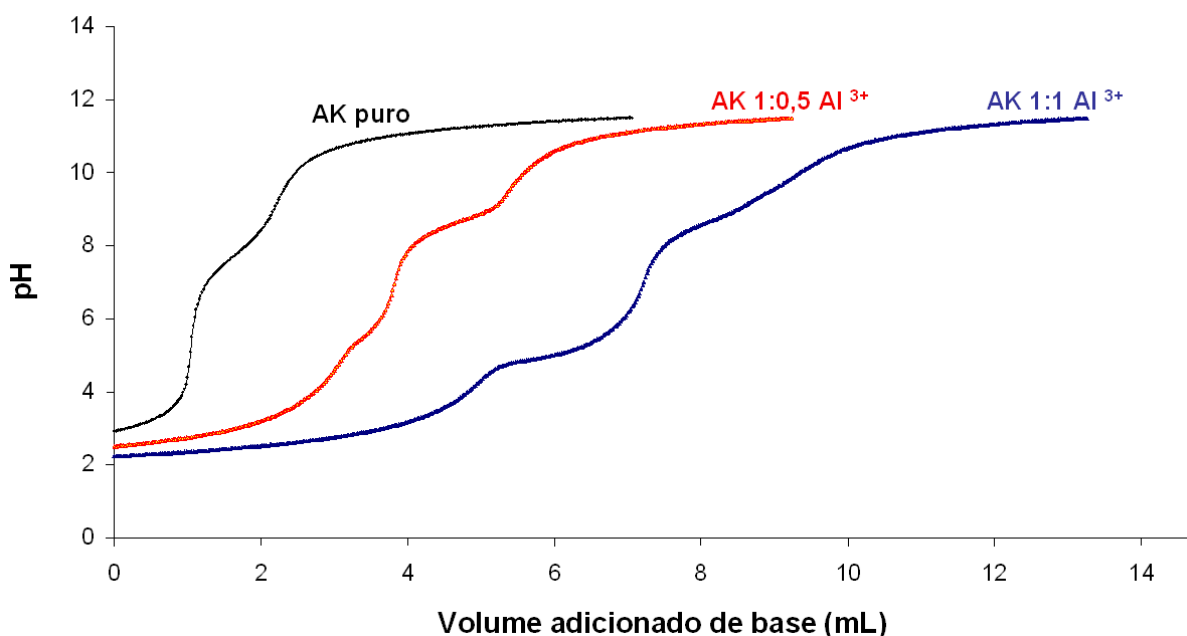


FIGURA 48 - CURVAS DE TITULAÇÃO DO AK NÃO COMPLEXADO (0,1 mmol) E PROPORÇÕES AK 1: 0,5 Al e AK 1:1 Al EM SOLUÇÃO AQUOSA
FONTE: O AUTOR (2009)

Murakami, em 1962, estudou como seriam os complexos formados com AK e ferro. Segundo ele, através de reações graduais de hidrólise, o complexo se formaria em equilíbrio em que poderiam ocorrer proporções de AK e ferro 1:1 ou 2:1 como pode ser visto na figura 49 e 50.

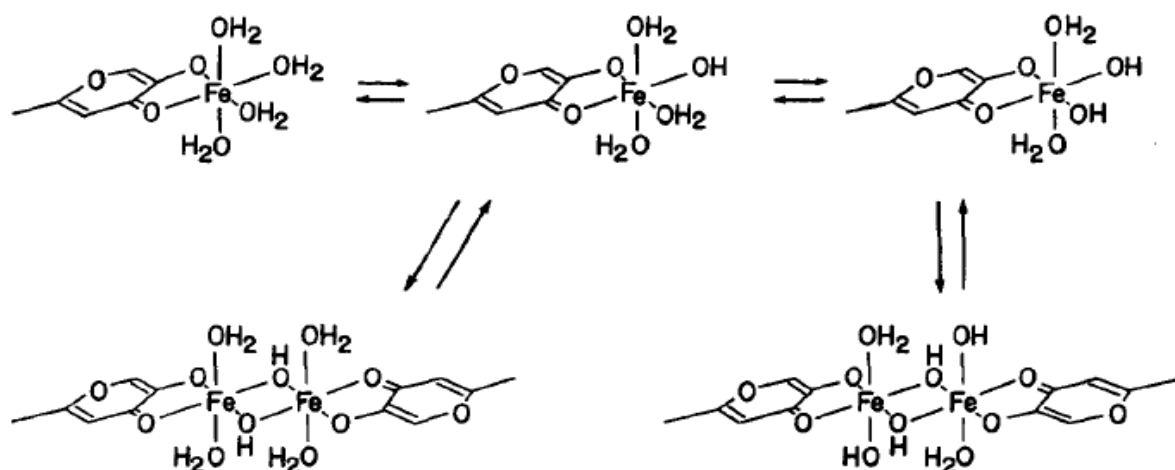


FIGURA 49 - REAÇÕES GRADUAIS DE HIDRÓLISE DO COMPLEXO Fe(III) 1 : 1 AK
FONTE: MURAKAMI, 1962b

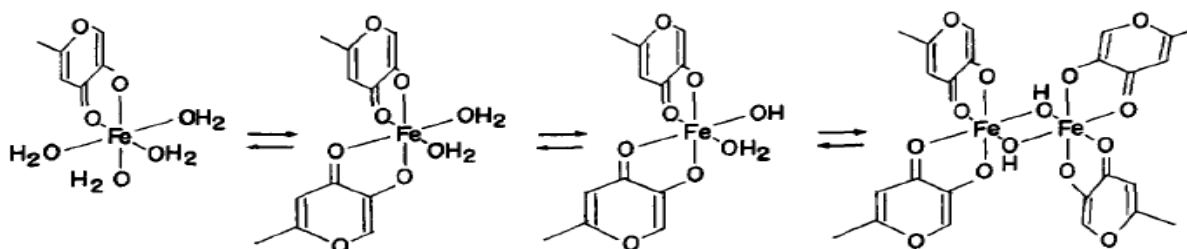


FIGURA 50 - REAÇÕES GRADUAIS DE HIDRÓLISE DO COMPLEXO Fe(III) 2 : 1 AK
FONTE: MURAKAMI, 1962b

O íon hidróxido substitui facilmente os grupos aquo enquanto grupos doadores de forte afinidade com o íon metálico em um ligante polidentado pode não ser substituído tão facilmente, mesmo em faixas elevadas de pH. A propriedade ácida do íon metálico central diminui conforme o número de coordenação com grupos doadores de carga negativa aumenta (MURAKAMI, 1962b).

Baseado nas estruturas complexas de AK e íons metálicos na literatura, pode-se sugerir que o íon metálico alumínio se complexa através a hidroxila desprotonada do C-5 e da carbonila C-4.

5.4.1 Espectroscopia no infravermelho

Uma das aplicações mais comuns da espectroscopia no infravermelho é a identificação de compostos orgânicos (STUART, 2004).

A espectroscopia no infravermelho é o método mais utilizado para a análise de complexos metal carbonila de acordo com HUHEEY *et al* (1993), pois pode-se

verificar nos resultados qualitativos dos espectros que a ligação π metal-carbono de carbonila aumenta a frequência e a ligação C-O diminui.

Os espectros, neste trabalho foram obtidos para o padrão, AK puro, e para as amostras contendo complexos de AK com alumínio. Em um primeiro momento, o objetivo foi verificar a pureza e identidade da amostra de AK através da comparação com um padrão. O espectro da amostra (figura 51) é igual ao do padrão, confirmando assim a identidade do analito.

A localização das bandas é muito importante, pois substâncias idênticas devem apresentar bandas nas mesmas regiões. Assim, no caso desta técnica, são fatores relevantes a correspondência e a similaridade das bandas.

Mesmo para moléculas relativamente simples, o espectro no infravermelho é geralmente complexo. Pela análise do espectro da amostra de AK, as atribuições prováveis de bandas relacionadas com o tipo de ligações são:

- estiramentos em 3273 e 3175 cm^{-1} de hidroxilas de álcool primário e fenólica. As bandas características observadas no espectro de álcoois e fenóis resultam do estiramento O-H e C-O (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Em geral a banda fenólica aparece entre $50\text{-}100\text{ cm}^{-1}$ da alcoólica (STUART, 2004). O deslocamento para frequências menores e alargamento da banda pode ser devido a ligações de hidrogênio intermoleculares (FURNISS *et al.*, 1989).

- estiramento da ligação $=\text{C-H}$ em 3101 cm^{-1} atribuída aos carbonos 3 e 6;
- estiramento da ligação de hidrogênio intramolecular e acoplamento por estiramento C-O e deformação O-H em 3075 cm^{-1} correspondente à porção superior e/ ou inferior da molécula;

- estiramento de $-\text{CH}_2-$ em 2843 cm^{-1} remete ao carbono 7;
- estiramento de CH_2 assimétrico de C sp^3 em 2926 cm^{-1} também de C-7;
- pico de CO_2 em 2343 e 2362 cm^{-1} , contaminação, provavelmente incorporado no preparo da pastilha e/ou variações do ar atmosférico no compartimento da amostra, não fazendo parte da estrutura da amostra;

- estiramento de C=O é observado em 1768 cm^{-1} . A intensidade desse pico está muito abaixo da esperada. As ligações de hidrogênio internas podem aumentar as interações de ressonância e perturbar significativamente o estiramento C=O (MAYO; MILLER; HANNAH, 2003). Quando um grupo ligado ao carbono da carbonila pode efetivamente fazer uma conjugação, seja pelo par de elétrons livres ou elétrons π , a direção e magnitude do deslocamento da frequência são

relacionadas ao balanço da deslocalização de tais elétrons e efeitos indutivos (FURNISS *et al.*, 1989). A banda em 1660 cm^{-1} além da carbonila também pode estar relacionada com os grupos $\text{C}=\text{C}-\text{H}$ e $\text{C}=\text{C}-\text{O}$. Insaturações adjacentes ao $\text{C}=\text{O}$ reduzem a absorção da carbonila (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005) (MAYO; MILLER; HANNAH, 2003); Ligações no carbono α podem resultar em diminuição no ângulo de ligação $\text{C}-\text{CO}-\text{C}$ e consequente aumento da frequência para valores entre $1750-1775\text{ cm}^{-1}$ (FURNISS *et al.*, 1989).

- estiramento $\text{C}=\text{O}$ que pode ser de cetona aromática ou $-\text{C}=\text{C}-\text{O}-$ em 1699 cm^{-1} ;
- quando a ligação $\text{C}=\text{C}$ está conjugada com o grupo carbonila mais dupla ligação aparece, mas não tão característica. O número de bandas observadas pode ser relacionado ao número de conjugações com as duplas ligações (FURNISS *et al.*, 1989) e neste caso aparecem duas bandas em 1602 e 1630 cm^{-1} ;
- deformação tesoura de $-\text{CH}_2-$ 1473 cm^{-1} do carbono 7;
- flexão no plano de $\text{O}-\text{H}$, estiramento $\text{C}-\text{O}$, deformação $\text{C}-\text{H}$ e flexão no plano de $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ de fenol em 1350 cm^{-1} ;
- resultante de estiramento $\text{C}-\text{C}-\text{C}$ e flexão de $\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}$ em 1284 cm^{-1} ;
- estiramento de ligação $\text{C}-\text{O}$ de fenol em 1226 cm^{-1} ;
- vibração simétrica $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ que pode estar acoplado a estiramento de $\text{C}-\text{O}$ e deformação no plano de $\text{O}-\text{H}$ de álcool primário em 1075 cm^{-1} ;
- banda em 850 cm^{-1} de deformação fora do plano $\text{C}-\text{H}$, estiramento assimétrico CH de $\text{C}=\text{C}$ encoberto em 3049 cm^{-1} , estiramento simétrico $\text{C}-\text{H}$ de $\text{C}=\text{C}$ em 3007 cm^{-1} e em 1699 cm^{-1} de alceno trissubstituído;
- flexão ou torção fora do plano de $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ em 767 cm^{-1} ;
- deformação angular fora do plano de $\text{O}-\text{H}$ em ligação hidrogênio próxima a 650 cm^{-1}
- deformação angular simétrica de ligações $\text{C}-\text{C}$ do anel próximas a 600 cm^{-1} .

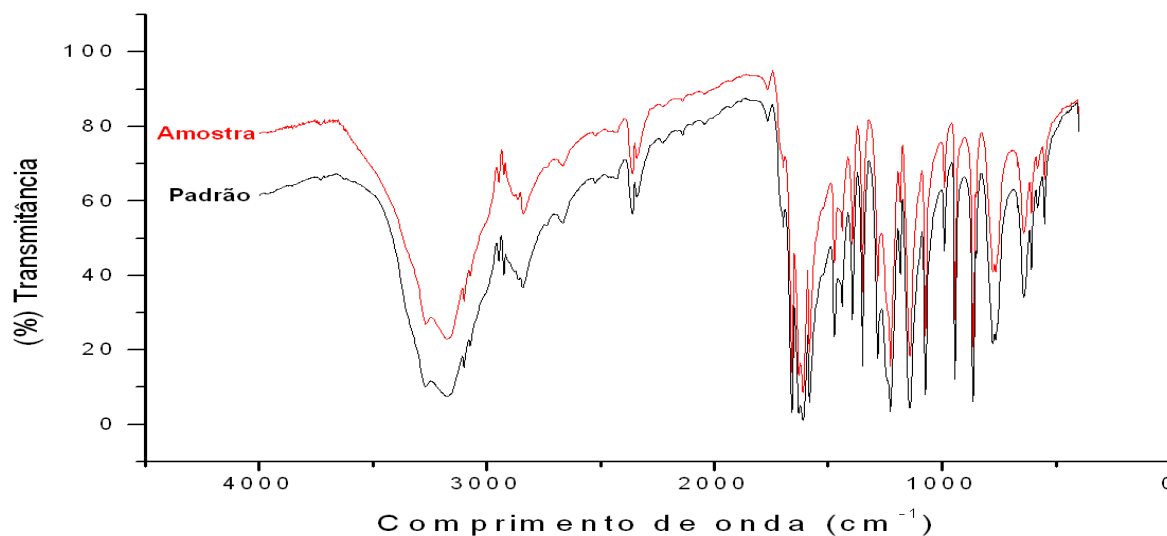


FIGURA 51 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO DO AK MATÉRIA-PRIMA EM COMPARAÇÃO COM O AK PADRÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO
 FONTE: O AUTOR (2008)

Para elucidação estrutural dos complexos deste trabalho ensaios no infravermelho foram realizados para o padrão e soluções da amostra com e sem alumínio, em diferentes valores de pH.

Para a obtenção de material sólido para a produção das pastilhas, as soluções foram liofilizadas e armazenadas em congelador a -80°C . Os espectros do AK padrão, em comparação com o pH 9 e 14 podem ser visualizados na figura 52; os espectros do complexo AK/Al^{3+} , em pH 1, 11 e 14, estão apresentados na figura 53; a comparação entre o padrão de AK e os diferentes pH do complexo na figura 54 e a comparação entre o pH 14 da solução de AK puro e do complexo, na figura 55. Os valores dos principais picos obtidos estão descritos na tabela 11.

Quando se compara o AK não complexado com a solução liofilizada pH 9 e 14 (figura 52) pode-se notar que a banda característica de OH próxima de 3200 cm^{-1} diminui sensivelmente em pH 9 e em 14 ela volta a aumentar em intensidade e também no intervalo de frequências onde ela ocorre (alargamento). É possível que no preparo da solução de pH 14 hidroxilas provenientes da base, e em excesso no equilíbrio dado o alto valor de pH, tenham se incorporado à matriz no processo de liofilização e também, que os compostos sejam mais higroscópicos. A banda próxima de 3075 cm^{-1} que poderia indicar ligação de hidrogênio intramolecular está encoberta ou não existe. O estiramento da ligação $=\text{C}-\text{H}$ em 3101 cm^{-1} pode ser observado em todos os espectros. Próximo a 1770 cm^{-1} a banda de $\text{C}=\text{O}$ em pH 9 e 14 não se caracterizam, enquanto a banda que pode ser de ligação $-\text{C}=\text{C}-$ ou $-\text{C}=\text{C}-$

O- em 1700 cm^{-1} parece estar sobreposta em pH 9 e mais intensa em 14, podendo ser referente à estrutura de ressonância que desloca parte da carga dos oxigênios para o anel. Em 1530 cm^{-1} não é observado o pico no espectro do AK padrão, mas essa banda aparece com grande intensidade nos espectros obtidos dos outros dois pHs. As bandas referentes à flexão no plano de O-H, estiramento C-O, deformação C-H e flexão no plano de C-O-H de enol em 1350 cm^{-1} não aparecem em pH 9. O estiramento C-C-C e flexão de C-C(=O)-C em 1284 cm^{-1} permanece em pH 9 e se desloca para 1300 cm^{-1} em pH 14.

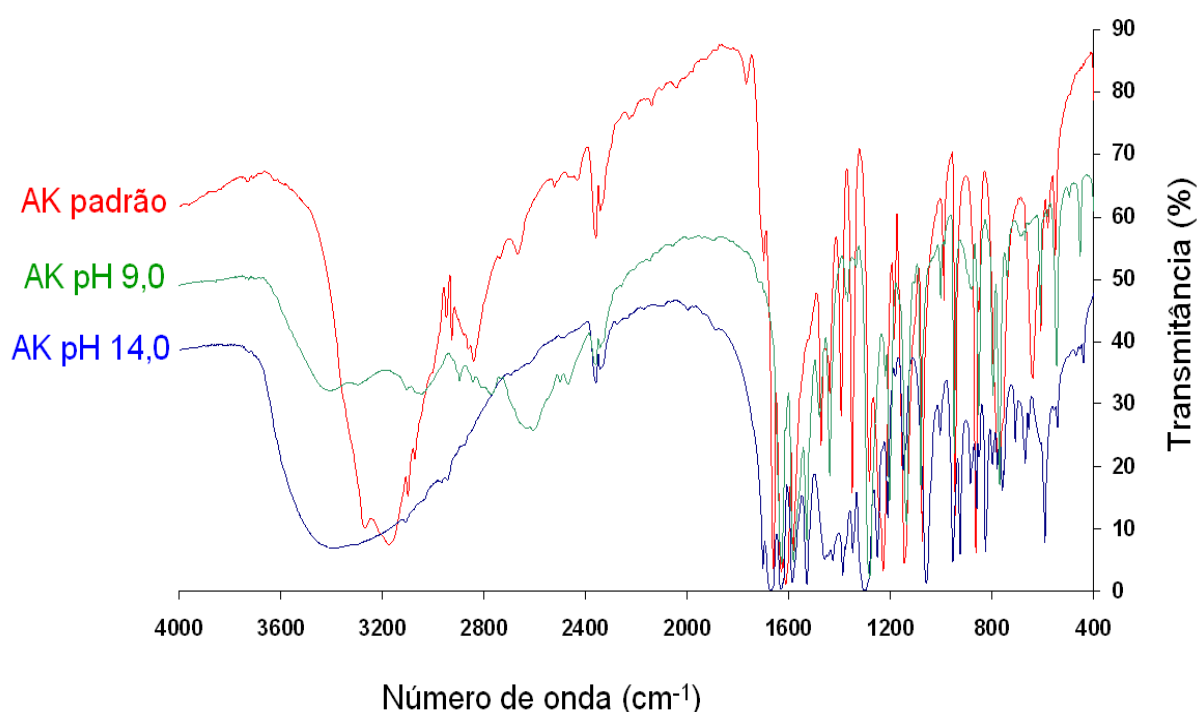


FIGURA 52 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO DO AK PADRÃO E A PARTIR DE SOLUÇÕES pH 9 E 14 NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO
 FONTE: O AUTOR (2009)

Na comparação entre os complexos AK:Al^{3+} nos pH 1, 11 e 14 (figura 53) nota-se que de 2000 a 4000 cm^{-1} há características semelhantes entre os espectros, com alargamento de banda próximo de 3200 cm^{-1} provavelmente pelo mesmo fato ocorrido com as soluções do analito puro e por serem, essas amostras, muito higroscópicas.

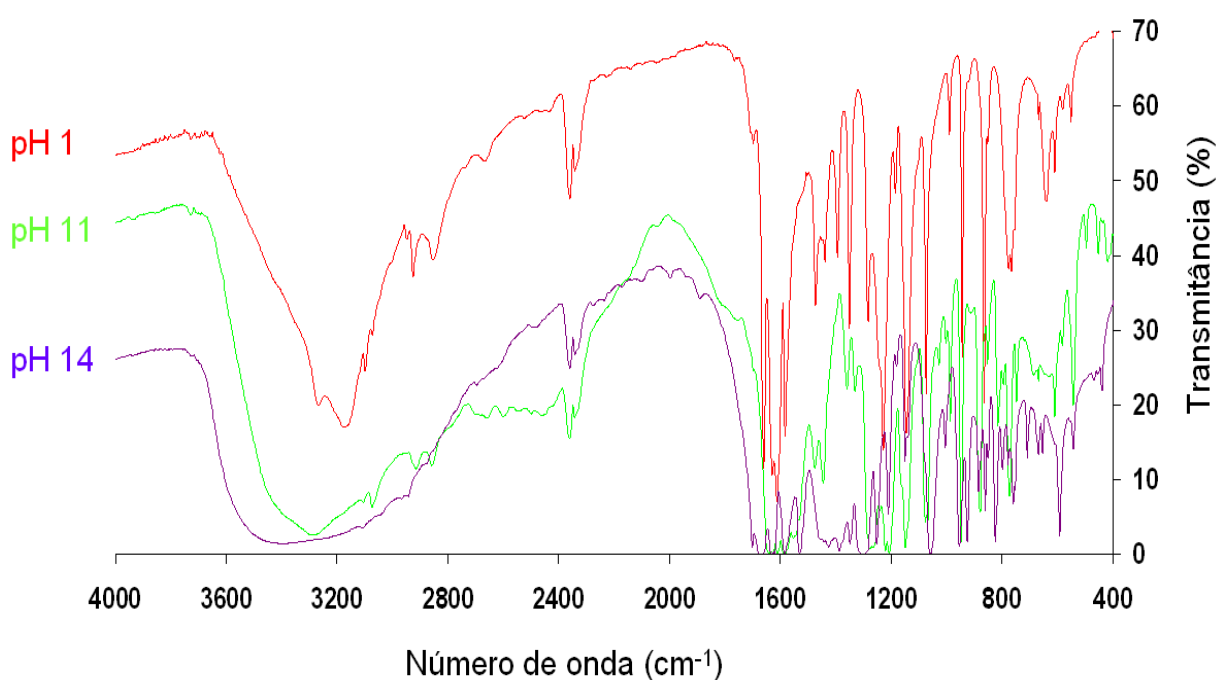


FIGURA 53 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO COMPLEXO AK / ALUMÍNIO A PARTIR DE SOLUÇÕES NOS pH 1, 11 E 14 NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO
 FONTE: O AUTOR (2009)

A comparação entre o AK não complexado com os complexos pode ser vista na figura 54. De 2000 a 4000 cm^{-1} não há grandes diferenças, apenas o alargamento da banda próxima de 3200 cm^{-1} em pH 11 e 14. Em 3075 a ligação de hidrogênio intramolecular está presente em todos os espectros, exceção do pH 14, indicando que possivelmente a hidroxila alcoólica pode estar próxima do oxigênio do anel, justamente pela livre rotação do carbono sp^3 vizinho de livre rotação. Somente o padrão apresenta banda de $\text{C}=\text{O}$ próximo de 1750 cm^{-1} , mas a de $-\text{C}=\text{C}$ e $-\text{C}=\text{C}-\text{O}-$ próximo de 1700 cm^{-1} está presente nos outros três valores. A ligação entre alumínio e oxigênio se dá também próximo a 1750 cm^{-1} e a banda ou está encoberta ou não está presente. Os espectros entre 1600-1700 cm^{-1} são muito semelhantes, região que caracteriza principalmente as ligações do tipo $-\text{C}=\text{C}-$ e $-\text{C}=\text{C}-\text{CO}-$. Entre 1600-1650 cm^{-1} o número de bandas pode ser igual ao número de conjugações presentes na molécula e apenas no pH 14 parece existir apenas uma banda, enquanto que nos outros pH e no padrão há 2 bandas. Bandas em 1610 cm^{-1} podem caracterizar ligação entre carbono e oxigênio com ressonância da carga entre os oxigênios e essa banda está presente no padrão, no complexo pH 1 e 11, mas parece não estar presente no pH 14. Entre 1500-1600 em geral se dá a ligação entre

o grupo fenil e um metal e nesse caso o padrão e o complexo pH 1 têm picos intensos de absorção em 1583 cm^{-1} e pH 11 e 14 parecem ter, mas sobrepostos enquanto que o pH 14 ainda tem em 1530 cm^{-1} e o pH 11 parece estar sobreposto e o padrão e pH 1 não têm. O espectro de infravermelho obtido por BHATIA *et al* (1988) tem uma banda intensa em 1655 cm^{-1} , o qual é assinalado à ligação C=O. Na complexação, esta frequência é reduzida cerca de 50 cm^{-1} , indicando que o grupo carbonila é quelado. A ligação C=C é deslocada de 1580 para 1560 cm^{-1} no complexo devido a formação de ligações de coordenação com o íon metálico (BHATIA; KAUSHIK; SODHI, 1988).

Aparentemente nenhum deles apresenta banda de C=O próximo de 1750 cm^{-1} , mas a de --C=C e --C=C-O- próximo de 1700 cm^{-1} está presente nos três valores. De acordo com o diagrama de especiação obtido com os dados da titulação potenciométrica, os sólidos que potencialmente poderiam trazer mais informações sobre o comportamento dos complexos no estado sólido, seriam entre pHs 6 e 10. Porém, dificuldades operacionais não permitiram a realização dos ensaios até o presente momento. Para maiores conclusões deste sistema por espectroscopia no infravermelho, espectros desses complexos devem ser obtidos no futuro. Não foi possível visualizar diferenças muito significativas e mais conclusivas no restante do espectro pela intensidade e sobreposição de bandas nos pH 11 e 14 a não ser na região de comprimentos de onda entre 1300 a 1420 cm^{-1} . Nesta região, o espectro do AK puro demonstra absorção referente às vibrações $\nu(\text{C-OH})$ e $\delta(\text{OH})$ (se atribui aos estiramentos simétricos do tipo tesoura e “wagging”), que desaparecem nos complexos a pH 11 e AK hidrolisado pH 9. Esta modificação comprova que o grupamento carbonil e o grupamento alfa-hidroxo estão ligados ao íon metálico alumínio (MASOUD, 1989; FRANCO; MERCÊ, 2006)

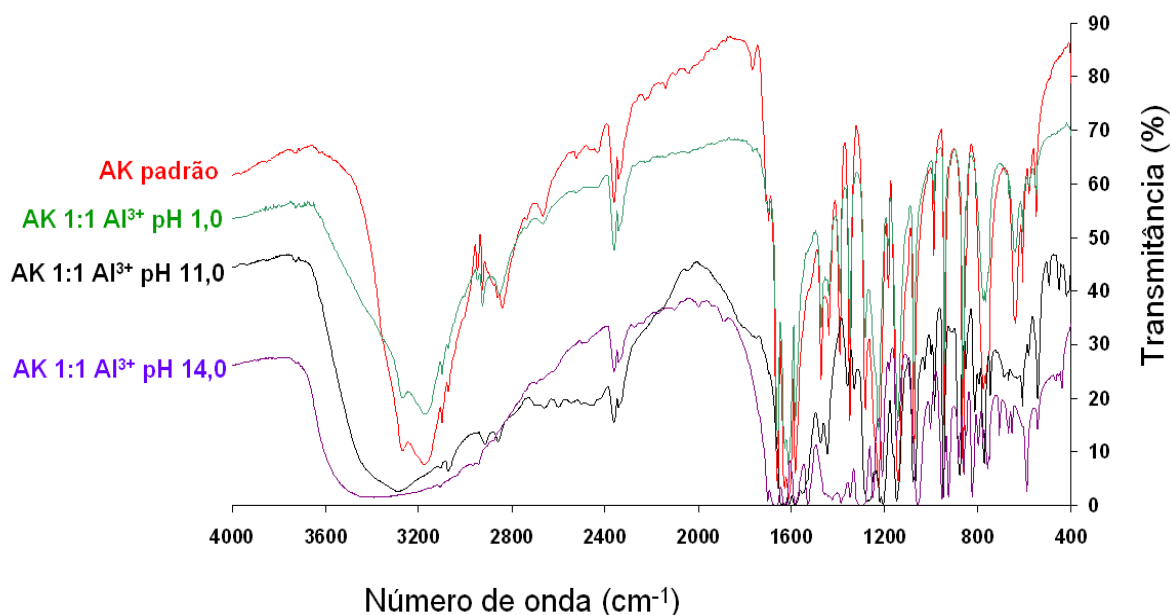


FIGURA 54 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO DO AK PADRÃO EM COMPARAÇÃO COM O COMPLEXO AK / ALUMÍNIO A PARTIR DE SOLUÇÕES NOS pH 1, 11 E 14 NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO
 FONTE: O AUTOR (2009)

Os espectros em pH 14 do analito não complexado e do complexo (figura 55) são exatamente iguais em toda a faixa entre 400-4000 cm⁻¹. A este valor de pH, o comportamento dos complexos é imprevisível com esse íon metálico.

Os picos mais significativos e suas respectivas atribuições mais prováveis podem ser visualizados na tabela 13.

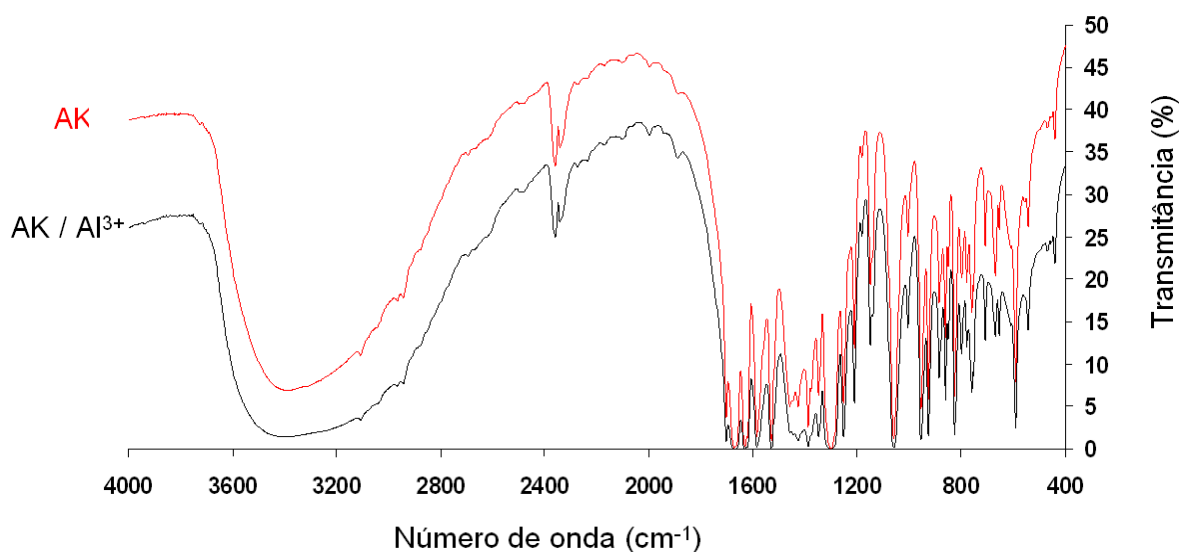


FIGURA 55 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO ÁCIDO KOJIKO pH 14 EM COMPARAÇÃO COM O COMPLEXO AK / ALUMÍNIO pH 14 NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO
 FONTE: O AUTOR (2009)

TABELA 13 – PICOS MAIS SIGNIFICATIVOS E ATRIBUIÇÕES MAIS PROVÁVEIS NO ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA VARIAÇÃO DE PH DO AK PURO E DO COMPLEXO AK/ALUMÍNIO

pH	Ácido kójico			Ácido kójico 1 : 1 Alumínio			Atribuição
	Padrão	9*	14*	1*	11*	14*	
	3273, F	3420, m 1290, F	3400, F,L	3180, F,L 3075	3295, F,L 3076	3400, F,L	O-H (CH ₂ OH)
	3175, F	-	3400, F,L				O-H fenol
		-	-	-	-	-	OH (H-ligado)
	1660, F 1685, f	1630, F	1710, F 1670, F 1630, F	1701, m 1658, F 1629, F	1699, m 1635, F	1703, F 1668, F 1635, F	C=O str.
	1630, F 1615, F 1583, F 865, F	1579, F	1585, F	1581, F 865, F	1585, F 1552, F 879, F	1585, F 1531, F 885, F 860, F	C=C C=C C=C C=C

F: forte ; m: médio; f: fraco; L: largo

*em solução aquosa e, posteriormente, liofilizado

FONTE: O AUTOR (2009)

O espectro do AK não complexado em pH 9 parece não ter pico que caracterize o estiramento da ligação C=C, o que poderia sugerir que neste pH o caráter de dupla está enfraquecido. Em 1290 cm⁻¹ tem a banda de O-H de álcool primário, mas a de fenol entre 1310-1410 cm⁻¹ não está bem caracterizado, da mesma forma entre 3250-3500 cm⁻¹. Em 1579 cm⁻¹ o pico pode corresponder à ligação –C=C-CO-.

Em 1965, MURAKAMI e MERA, publicaram alguns estudos por infravermelho do AK puro e quelado com os metais cobre (II), zinco (II), níquel (II) e cobalto (II). Pelos picos de absorção desses quelatos observa-se que eles são praticamente idênticos, com uma leve diferença para o cobre em relação aos outros três como pode ser observado na tabela 14.

Tabela 14 – PICOS SIGNIFICANTES NO ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DE ALGUNS QUELATOS DE AK

Kojic acid	Cu (II) –kojate	Zn (II)-kojate	Ni (II)-kojate	Co (II)-kojate	Atribuição
3290 m	3175 m, b 3090 m	3085 m	3085 m	3090 m	O-H (CH ₂ OH)
3215 m,b					O-H fenol
	2680 w	2760 w 2610 w, b 2440 w	2755 w 2590 w, b 2440 w	2760 w 2590 w, b 2450 w	OH (H-ligado)
1710 w 1668 s	1635 s	1634 s	1634 s	1635 s	C=O
1640 s 1621 s 1591 s 865 s	1580 s 1535 s 895 m 876 w 867 m	1572 s 1540 s 905 m	1570 s 1540 s 905 m	1570 s 1550 s 905 m	C=C

s: forte ; m: medio; w: fraco; b:largo

FONTE: MURAKAMI; MERA, 1965

O comportamento espectral quase idêntico entre os quelatos de zinco, níquel e cobalto sugerem que eles possuem ligações de coordenação de características praticamente idênticas (MURAKAMI; MERA, 1965).

De acordo com os dados, o mesmo autor propõe estruturas de ressonância para o AK puro (figura 56) e de coordenação com metais (figura 57). Os deslocamentos de C=O e C=C para frequências mais baixas parecem indicar que a contribuição das estruturas de ressonância de II a IV, no qual o átomo de hidrogênio é substituído por um íon metálico, se tornam maiores com a formação das ligações de coordenação com o metal (MURAKAMI; MERA, 1965). Essas estruturas propostas na literatura são coerentes com os dados espectrais obtidos neste trabalho, tanto por titulação potenciométrica como por espectroscopia no infravermelho.

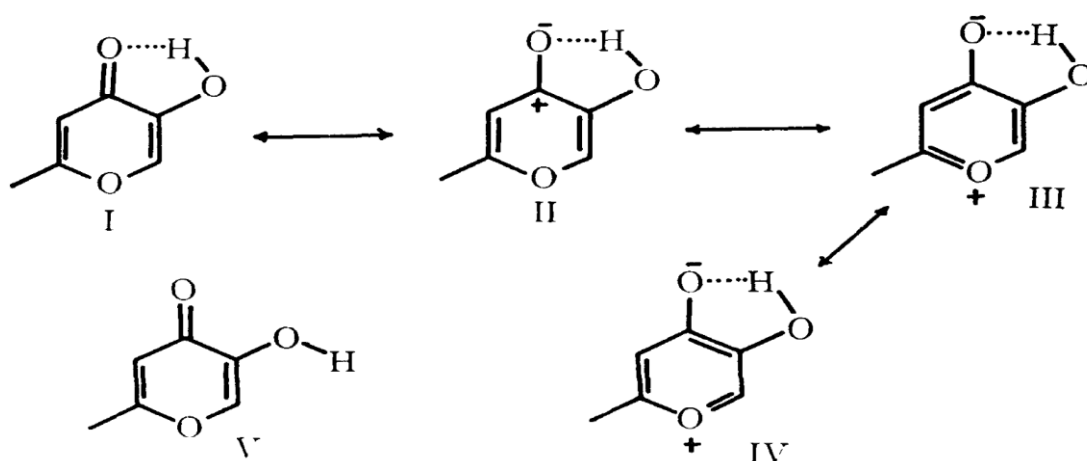


FIGURA 56 – POSSÍVEIS ESTRUTURAS DE RESSONÂNCIA DO AK
FONTE: MURAKAMI; MERA, 1965

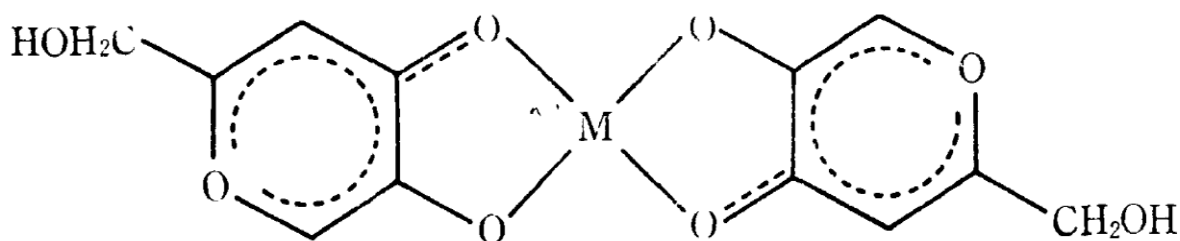


FIGURA 57 – POSSÍVEL ESTRUTURA DE RESSONÂNCIA DO AK COMPLEXADO
FONTE: MURAKAMI; MERA, 1965

5.4.2 Ressonância magnética nuclear

Sob condições apropriadas uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequência em uma frequência governada pelas características estruturais da amostra. A absorção é função de determinados núcleos da molécula (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979).

Para confirmar as coordenações e quais grupos químicos da molécula do AK estariam envolvidos na complexação com o alumínio foram feitos ensaios de ressonância magnética nuclear de ^{13}C .

O primeiro experimento foi realizado com solução concentrada de AK puro (7,5 mg/ mL) em meio aquoso, com pH iguais a 4, 7, 9 e 11 como pode ser visualizado pela figura 58, exceto pH 9.

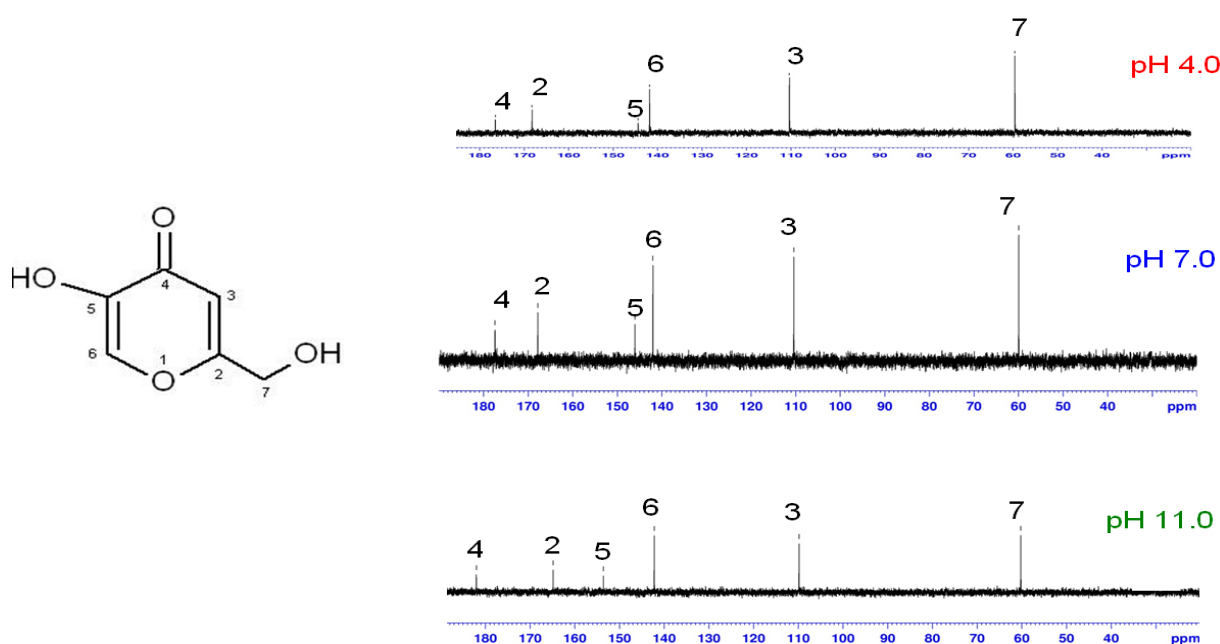


FIGURA 58 – ESPECTROS DE RMN E DADOS OBTIDOS EM pH 4, 7 E 11 DO ÁCIDO KÓJICO NÃO COMPLEXADO
FONTE: O AUTOR (2009)

Os carbonos numerados como 3, 6 e 7 não sofreram deslocamento químico significativo, somente os carbonos 2, 4 e 5 como estão representados nas tabelas 15 e 16.

TABELA 15 – VALORES DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DOS CARBONOS DO ÁCIDO KÓJICO NÃO COMPLEXADO EM DIVERSOS pH

	δ (ppm) (RMN ^{13}C) AK puro					
pH	C2	C3	C4	C5	C6	C7
4	168,2	110,3	176,4	144,4	141,8	59,6
7	167,8	110,4	177,5	146,1	142,0	60,0
9	165,3	110,0	181,2	152,0	142,2	60,2
11	164,9	109,8	182,0	153,6	142,2	60,2
14	166,0	109,2	181,6	153,0	141,9	60,2
$\Delta \delta$	-2,2	-0,5	+5,2	+8,6	+0,1	+0,6

FONTE: O AUTOR (2009)

TABELA 16 – COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DOS CARBONOS DO AK PELA VARIAÇÃO DE pH

	δ (ppm) (RMN ^{13}C) AK puro					
pH	C2	C3	C4	C5	C6	C7
4	168,2	110,3	176,4	144,4	141,8	59,6
$\Delta \delta$ 7	-0,4	-0,1	+1,1	+1,7	+0,2	+0,4
$\Delta \delta$ 9	-2,9	-0,3	+4,8	+7,6	+0,4	+0,6
$\Delta \delta$ 11	-3,3	-0,5	+5,6	+9,2	+0,4	+0,6
$\Delta \delta$ 14	-2,2	-0,5	+5,2	+8,6	+0,1	+0,6
$\Delta \delta$	-2,2	-0,5	+5,2	+8,6	+0,1	+0,6

FONTE: O AUTOR (2009)

O carbono 2 sofreu um deslocamento químico para campo mais alto com um $\Delta \delta$ de -2,2, ou seja, com a variação de pH ele se protegeu mais. Isso se deve ao fato de que provavelmente ele recebeu elétrons doados pelo grupo alquil ligado diretamente a ele. Os carbonos 4 e 5 sofreram um deslocamento químico mais intenso, principalmente o 5 que estava ligado diretamente à hidroxila enólica. Nota-se que os deslocamentos nesses carbonos são crescentes e proporcionais, exceto quando se considera o pH 14, com uma variação mais significativa na transição de pH 7 para 9 que é a faixa em que se encontra o pKa do analito. O carbono 3 provavelmente sofreu dois β -shift, um de cada lado e por isso ficou praticamente sem nenhum deslocamento evidente. A partir dos dados de RMN foi possível criar uma hipótese de como estaria a molécula em pH ácido (figura 59 - A) e alcalino (figura 57- B).

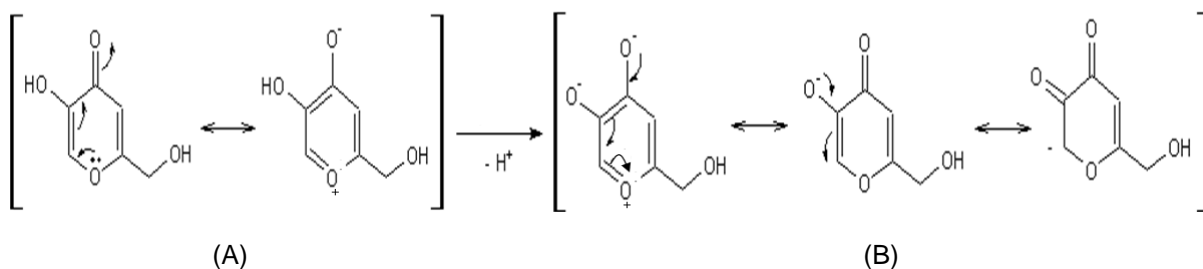


FIGURA 59 – ESTRUTURAS HIPOTÉTICAS DA RESSONÂNCIA DO AK NA FORMA ÁCIDA (A) E BÁSICA (B)

FONTE: O AUTOR (2010)

Da mesma forma foram realizados ensaios com a proporção AK 1:1 Al^{3+} , mas apenas na faixa ácida (pH 2 e 4), uma vez que o alumínio precipita em pH básico, como está representada através da tabela 17.

TABELA 17 - VALORES DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DOS CARBONOS DO ÁCIDO KÓJICO COMPLEXADO COM ALUMÍNIO EM pH 2 e 4

pH	δ (ppm) (RMN ^{13}C) AK 1:1 Al^{3+}					
	C2	C3	C4	C5	C6	C7
2	168,0	110,2	176,1	143,9	141,6	59,5
	171.2	105.8	177.9	149.3	142.0	60.0
4	171.3	105.9	178.1	149.4	141.8	60.0
$\Delta \delta$	-0.1	-0.1	-0.2	-0.1	+0.2	0

FONTE: O AUTOR (2009)

Observa-se que em pH 2 o analito não está totalmente na forma complexada por apresentar dois grupos de valores significativos de deslocamentos para cada carbono, sendo que um deles é praticamente coincidente ao valor obtido do AK puro. Considerando apenas a variação do deslocamento químico dos complexos não houve diferença significativa.

Quando se compara em um mesmo pH os deslocamentos químicos obtidos do AK puro com a proporção AK 1:1 Al^{3+} percebe-se que há uma variação no deslocamento mais evidentes nos carbonos 2, 3, 4 e 5 como está representada na tabela 18.

TABELA 18 - COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DOS CARBONOS DO AK PURO E COMPLEXADO COM ALUMÍNIO EM pH 4

	δ (ppm) (RMN ^{13}C) pH 4.0					
	C2	C3	C4	C5	C6	C7
AK puro	168.2	110.3	176.4	144.4	141.8	59.6
AK + Al	171.3	105.9	178.1	149.4	141.8	60.0
$\Delta \delta$	+3.1	-4.4	+1.7	+5.0	0	+0.4

FONTE: O AUTOR (2009)

O carbono 3 sofre um deslocamento para campo mais alto, protegendo-se mais e isso pode ser devido ao fato de que houve um aumento do trânsito eletrônico. Os carbonos 2, 4 e 5 sofreram deslocamento para campo mais baixo, e desblindando mais. Para o carbono 2 pode ser que como ele tinha uma dupla ligação e agora há uma divisão de carga a proteção eletrônica é menor. O carbono 4 sofreu o menor deslocamento dos três, mas deve ser porque deslocamento químico de cetona já é alto e por isso não sofreria uma alta variação. O carbono 5 teve o maior deslocamento, para campo mais baixo, desblindando-se, pois está ligado

diretamente ao oxigênio que fez a ligação com o metal e este por sua vez atrai mais os elétrons para si, também fazendo com que houvesse menor carga eletrônica para protegê-lo. Na figura 60 representa-se uma hipótese de uma das possíveis espécies complexadas de AK com alumínio em pH 4 na proporção AK 1:1 Al^{3+} .

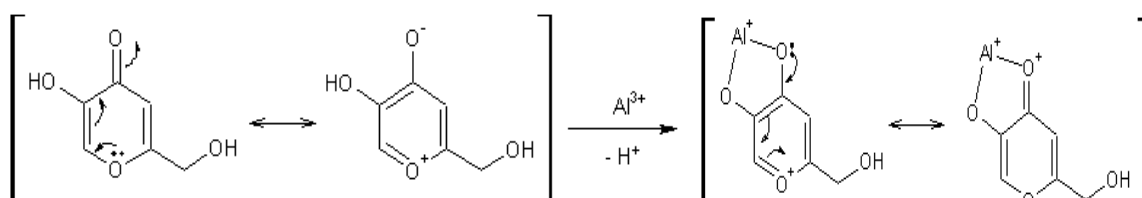


FIGURA 60 – ESTRUTURAS HIPOTÉTICAS DE UMA DAS REPRESENTAÇÕES DO AK COMPLEXADO EM pH 4
FONTE: O AUTOR (2009)

Na especiação por ionização por eletrospray com íon trap e transformada de Fourier evidencia-se que o AK forma complexo com todos os metais 3^+ (exceto As^{3+} em que o sinal é provavelmente muito baixo). O complexo envolve um metal (M^{3+}), dois íons de AK desprotonados (AK^-) e uma molécula de AK (HKA) (STENSON; CIOFFI, 2007).

Em um estudo realizado por KINGSBURY *et al* (1975) de ressonância magnética nuclear para o AK e alguns derivados foram obtidos valores de deslocamentos químicos muito próximos aos encontrados no presente trabalho como pode ser visualizado na figura 61 e na tabela 19.

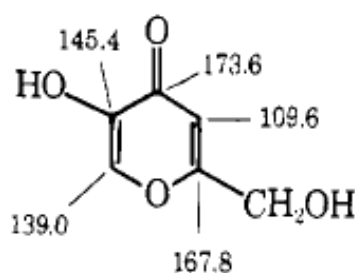


FIGURA 61 – ESTRUTURA QUÍMICA DO AK com OS ASSINALAMENTOS POR RMN ^{13}C EM $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$
FONTE: KINGSBURY *et al* (1975)

TABELA 19 – COMPARAÇÃO DOS DADOS DE ASSINALAMENTOS DOS CARBONOS DO AK POR RMN ^{13}C - DADOS DA LITERATURA COM OS OBTIDOS NO PRESENTE TRABALHO

	δ (ppm) (RMN ^{13}C) AK puro					
	C2	C3	C4	C5	C6	C7
KINGSBURY <i>et al</i> (1975) (AK 17,0 mg/mL)	167,8	109,6	173,5	145,4	139,0	59,3
Presente Trabalho (AK 7,5 mg/ mL)	168,2	110,3	176,4	144,4	141,8	59,6

FONTE: O AUTOR (2009)

Os valores são muito parecidos, entretanto os solventes utilizados foram diferentes e talvez esse seja o motivo pelo qual os deslocamentos não são exatamente iguais. O solvente utilizado neste trabalho foi água e água deuterada 10%, enquanto que o utilizado por KINGSBURY *et al* (1975) foi $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$.

De acordo com JAIN; KAUSHIK (1997) pelos experimentos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do AK pode-se verificar que na complexação o pico correspondente à hidroxila fenólica desaparece e que o deslocamento para campo mais baixo de dois hidrogênios são atribuídos ao envolvimento da carbonila do carbono 4 e do grupo fenólico do carbono 5.

Todos os dados experimentais do presente trabalho confirmam que o AK coordena o íon metálico alumínio, e que provavelmente essa complexação se dá preferencialmente através o átomo de oxigênio do grupo $-\text{OH}$ fenólico e a carbonila do C-4, formando uma estrutura de um quelato com anel de 5 membros em valores de pH entre 6 e 10, preferencialmente.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho foram obtidas as seguintes conclusões:

- O método por UV desenvolvido, com base nas propriedades de complexação do AK com cátions metálicos mostrou-se adequado para a quantificação do AK na matéria-prima e nos cremes, mesmo quando em associação com hidroquinona e na presença de conservantes.

- A reação de complexação AK-AI apresenta uma certa seletividade em relação à ligação, e também permitiu tornar o método espectrofotométrico mais seletivo, deslocando a banda de absorção máxima do AK puro de 269 nm para 305 nm quando complexado.

- A vantagem da utilização do metanol como solvente é o fato de permitir um deslocamento da banda de absorção do complexo para comprimento de onda maior (305 nm) do que aquele quando se utilizou água (298 nm). E também no caso do produto contendo conservantes este facilita a eliminação do nipagin, pois o mesmo fica insolúvel nesse meio, podendo ser facilmente separado por filtração.

- O pH é uma propriedade que deve ser levado em consideração nas condições de execução do método, e não deve ser maior que 3, pois em valores superiores ocorre turvação.

- O método desenvolvido atendeu os limites estabelecidos para os parâmetros de validação linearidade ($r > 0,999$ na faixa de 5-50 $\mu\text{g/mL}$), exatidão (recuperação próxima de 100%), precisão (DPR de 0,402%, 1,284 e 1,192 para 10, 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$ na repetitividade; DPR de 2,171, 0,976 e 0,439 10, 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$ na precisão intermediária) e robustez (pH, tempo de leitura e temperatura) conforme normas nacionais e internacionais;

- Por este método, uma vez desenvolvido e validado, obteve-se respostas satisfatórias nas análises de quantificação do AK em produtos feitos à base de creme não iônico e creme lanette, mostrando-se apto para ser usado na rotina laboratorial para este tipo de análise.

- As principais vantagens do método, em relação aos métodos já descritos na literatura, é ser de baixo custo, requerer reagentes e equipamentos acessíveis e simples, é de fácil execução e rápido.

- A comparação de espectros no IV do AK puro e do complexo AK-íon metálico, em diferentes valores de pH, foi um recurso que permitiu correlacionar as modificações na absorção do grupamento enólico e carbonílico complexados.

- Pela análise dos espectros de RMN ^{13}C , através dos deslocamentos químicos de, principalmente C-5, pode-se inferir que a complexação sugerida pelos dados da titulação potenciométrica e da espectroscopia no infravermelho, estão de acordo com os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN obtidos.

- Pelos dados de especiação por titulação potenciométrica verificou-se que o ácido kójico complexa o íon alumínio de diferentes maneiras: dependendo da proporção molar em que eles se encontram e da faixa de pH, os complexos obtidos são bem diversos. Dois modelos se ajustaram perfeitamente, ou seja, a curva experimental coincidiu igualmente com a curva da simulação matemática: o primeiro com o ácido kójico perdendo um próton da hidroxila do C-5. No segundo modelo matemático, o AK ainda poderia perder um segundo próton, do OH alcoólico do C-7. Esse modelo matemático mostrou-se incoerente com os fatos e hipóteses químicas, tendo sido descartado após análise dos resultados das técnicas analíticas empregadas e de resultados publicados na literatura.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS

ABDEL-WANIS, M. E.; NAWAHARA, N. Skeletal disorders associated with skin pigmentation: a role of melatonin? **Medical Hypotheses**, v. 61, n. 5-6, p.640-642, 2003.

AHN, K. S. *et al.* Downregulation of NF-kappaB activation in human keratinocytes by melanogenic inhibitors. **Journal of Dermatological Science**, v. 31, n. 3, p.193-201, 2003.

ALDERIGHI, L.; GANS, P.; LENCO, A.; PETERS, D.; SABATINI, A.; VACCA, A. Hyperquad simulation and speciation (HySS): a utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species, **Coordination Chemistry Reviews**, v.184, p. 311-318, 1999.

ANVISA. Diário Oficial da União,. Resolução n 899 de 29 maio de 2003 que determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos.

ARCANS, J. *et al.* Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells. **Experimental Cell Research**, v. 268, n. 1, p.26-35, 2001.

ARNSTEIN, H. R. V.; BENTLEY, R. The biosynthesis of kojic acid. 1. Production from [1-¹⁴C] and [3:4-¹⁴C₂]glucose and [2-¹⁴C]-1:3-dihydroxyacetone. **Biochemical Journal**, v. 54, n. 3, p.493-508, 1953a.

_____. The biosynthesis of kojic acid. 3. The incorporation of labelled small molecules into kojic acid. **Biochemical Journal**, v. 54, n. 3, p.517-522, 1953b.

_____. The biosynthesis of kojic acid. 4. Production from pentoses and methyl pentoses. **Biochemical Journal**, v. 62, n. 3, p.403-411, 1956.

ARTISTRY. **Understanding Your Skin Structure**. Disponível em: <<http://www.artistry.com/en/skincare/understanding-your-skin-structure-10616.aspx>>
Acesso em:16-12-2009.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de Química - Questionando a vida moderna e o meio ambiente**. ed. Porto Alegre: Bookman, 2001.

BAES, C. F.; MESMER, R. E. The Hydrolysis of Cations; John Wiley & Sons; New York, 1976, p. 211-218.

BATTAINI, G. *et al.* Inhibition of the catecholase activity of biomimetic dinuclear copper complexes by kojic acid **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 5, n. 2, p.262-268, 2000.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências – Desvendando o Sistema Nervoso**. 2^a. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2002.

BENTLEY, R. From miso, sake and shoyu to cosmetics: a century of science for kojic acid. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 6, p.1046-62, 2006.

BHATIA, S.; KAUSHIK, N. K.; SODHI, G. S. Thermal studies of organomercury(II) complexes of kojic acid and maltol. **Journal of physics C: solid state physics**, v. 21, n. 26, p.4981-4685, 1988.

BOULANGER, B. *et al.* Risk management for analytical methods based on the total error concept: Conciliating the objectives of the pre-study and in-study validation phases. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 86, n. 2, p.198-207, 2007.

BRENNER, M.; HEARING, V. J. Modifying skin pigmentation – approaches through intrinsic biochemistry and exogenous agents. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, 2008.

BRIGANTI, S.; CAMERA, E.; PICARDO, M. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. **PIGMENT CELL RESEARCH**, v. 16, n. 2, p.101-110, 2003.

BRITO, N. M. *et al.* Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, n., p.129-146, 2003.

BRTKO, J. *et al.* Kojic acid and its derivatives: history and present state of art. **Central European Journal of Public Health**, v. 12, n., p.S16-S18, 2004.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M.-L. Practical method validation: Validation sufficient for an analysis method. **Mikrochimica Acta**, v. 128, n. 1-2, p.93-106, 1998.

BUBACCO, L. *et al.* X-ray absorption analysis of the active site of Streptomyces antibioticus Tyrosinase upon binding of transition state analogue inhibitors. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 465, n. 2, p.320-327, 2007.

BURDOCK, G. A.; SONI, M. G.; CARABIN, I. G. Evaluation of Health Aspects of Kojic Acid in Food. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 33, n. 1, p.80-101, 2001.

CABANES, J.; CHAZARRA, S.; GARCIACARMONA, F. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 46, n. 12, p.982-985, 1994.

CHEN, J. S.; WEI, C. I.; MARSHALL, M. R. Inhibition-mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 39, n. 11, 2001.

CHOI, S. Y. *et al.* Synthesis, discovery and mechanism of 2,6-dimethoxy-N-(4-methoxyphenyl)benzamide as potent depigmenting agent in the skin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 349, n. 1, p.39-49, 2006.

CORRER, C. J. *et al.* Determinação de ácido kójico em produtos farmacêuticos por espectroscopia UV-Vis e processo de calibração multivariada. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, n. 3, p.416-20, 2005.

COSTIN, G. E.; HEARING, V. J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. **FASEB Journal**, v. 21, n. 4, p.976-94, 2007.

COTOLLESSA, C. *et al.* The use of chemical peelings in the treatment of different cutaneous hyperpigmentations. **Dermatologic surgery**, v. 25, n. 6, p.450-454, 2001.

COTTON, F. A.; WILKINSON, G. **Química Inorgânica**. ed: Livros técnicos e científicos, 1978.

CURTO, E. V. *et al.* Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: in vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, n. 6, p.663-672, 1999.

DABROS, W.; KORDOWIAK, A. M. Comparison of bipyridyl, maltol and kojic acid action as organic vanadium ligands on activity of galactosyltransferase (EC 2.4.1.38) some physiological parameters and ultrastructure of Golgi complexes in rat hepatocytes. **Folia Histochemica ET Cytobiologica**, v. 45, n. 3, p.239-244, 2007.

DEL MARMOL, V. *et al.* TRP-1 expression correlates with eumelanogenesis in human pigment cells in culture. **FEBS Letters**, v. 327, n. 3, p.307-10, 1993.

DOMNIN, I. N. *et al.* Fragmentation of some 4H-Pyran-4-one and pyridin-4-one derivatives under electron impact. **Russian Journal of Organic Chemistry**, v. 44, n. 9, p.1369-1373, 2008.

EMAMI, S. *et al.* Kojic acid and its manganese and zinc complexes as potential radioprotective agents. **Bioorganic Medical Chemistry Letters**, v. 17, n. 1, p.45-8, 2007.

FARARD, J. *et al.* A convenient synthesis of 5-aryl amino-4H-pyran-4-ones using palladium-catalyzed amination. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 41, p.5729-5732, 2009.

FAUST, C. B. *et al.* Speciation of aqueous mononuclear Al (III)-hydroxo and other Al (III) complexes at concentrations of geochemical relevance by aluminum-27 nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 59, n. 13, p.2651-2661, 1995.

FDA. International Conference on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology; Availability. Federal Register. V. 60 (40) p. 11260-11262, March, 1995.

FEINBERG, M. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. **Journal of chromatography A**, v. 1158, n. 1-2, p.174-183, 2007.

FELIX, C. C. *et al.* Interactions of melanin with metal ions. Electron spin resonance evidence for chelate complexes of metal ions with free radicals. **Journal of the american chemical society**, v. 100, n. 12, p.3922-3926, 1978.

FOGARTY, R. V.; TOBIN, J. M. Fungal melanins and their interactions with metals. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 4, p.311-7, 1996.

FOURNIER, A. C.; SHAFRAN, K. L.; PERRY, C. C. Potentiometric determination of the 'formal' hydrolysis ratio of aluminium species in aqueous solutions. **Analytica Chimica Acta**, v. 607, n. 1, p.61-73, 2008.

FRANCO, A. P.; MERCÊ, A. L. R. Complexes of carboxymethylcellulose in water. 1: Cu^{2+} , VO^{2+} and MO^{6+} . **Reactive and Functional Polymers**. v.66, p. 667-681, 2006

FRIEDMAN, M. Food browning and its prevention: An overview. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 44, n. 3, p.631-653, 1996.

FRISVAD, J. C. High-performance liquid chromatographic determination of profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. **Journal of chromatography**, v. 392, n., p.333-347, 1987.

FURNISS, B. S. *et al.* **Vogel's Textbook of practical organic chemistry**. 5^a. ed. London: Longman scientific and technical, 1989.

GANS, P.; SABATINI, A.; VACCA, A. **Talanta**, v. 43, p.1739-1753.1993

GOMARA, F. L. *et al.* Desarrollo y validación de un método espectrofotométrico para cuantificación de ácido kójico. **Ars Pharmaceutica**, v. 45, n. 2, p.145-153, 2004.

GOMES, A. J. *et al.* The antioxidant action of Polypodium leucotomos extract and kojic acid: reactions with reactive oxygen species. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34 n. 11, p.1487-1494, 2001.

GONÇALVES, M. L. S. S. **Métodos instrumentais para análise de soluções**. 2^a. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990.

GOTO, T.; MATSUI, M.; KITSUWA, T. Analysis of Aspergillus mycotoxins by gas chromatography using fused silica capillary column. **Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.**, v. 31, n., p.43-47, 1990.

GOULD, B. S. The metabolism of *Aspergillus tamarii* Kita. Kojic acid production. **Biochemical Journal**, v. 32, n. 5, p.797-802, 1938.

GRDINIC, V.; VUKOVIC, J. Prevalidation in pharmaceutical analysis Part I. Fundamentals and critical discussion. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 3, p.489–512, 2004.

HALDER, R. M.; RICHARDS, G. M. Topical agents used in the management of hyperpigmentation. **Skin Therapy Letters**, v. 9, n. 6, p.1-3, 2004.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC. S.A, 2001.

HEARING, V. J.; EKEL, T. M. Mammalian tyrosinase. A comparison of tyrosine hydroxylation and melanin formation. **Biochemical Journal**, v. 157, n. 3, p.549-57, 1976.

HEARING, V. J.; TSUKAMOTO, K. Enzymatic control of pigmentation in mammals. **FASEB Journal**, v. 5, n. 14, p.2902-9, 1991.

HEDLUNT, T.; OHMAN, L. O. Equilibrium and structural studies of silicon (IV) and aluminum (III) in aqueous-solution. 19. Composition and stability of aluminum complexes with kojic acid and maltol. **Acta chemica scandinavica series A-physical and inorganic chemistry**, v. 42, n. 10, p.702-709, 1988.

HERRLING, T.; JUNG, K.; FUCHS, J. The role of melanin as protector against free radicals in skin and its role as free radical indicator in hair. **Spectrochimica Acta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 69, n. 5, p.1429-1435, 2008.

HESSE, M.; MEIER, H.; ZEEH, B. **Spectroscopic Methods in Organic Chemistry**. 2. ed. Stuttgart - New York: Die Deutsche Bibliothek, 2008.

HOLLAS, J. M. **Modern spectroscopy**. 4^a. ed. New York: John Wiley and sons, 2004.

HOOGDUIJN, M. J. *et al.* Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H₂O₂-induced DNA strand breaks through its ability to bind Ca²⁺. **Experimental Cell Research**, v. 294, n. 1, p.60-67, 2004.

HUANG, S. C. *et al.* Simultaneous Determination of Magnesium Ascorbyl Phosphate, Ascorbyl Glucoside, Kojic Acid, Arbutin and Hydroquinone in Skin Whitening Cosmetics by HPLC **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 12, n. 1, p.13-18, 2004.

HUBERT, P. *et al.* Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal—part I. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 3, p.579-586, 2004.

_____. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal—part II. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, n. 1, p.70-81, 2007.

_____. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal—part III. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, n. 1, p.82-96, 2007.

HUHEEY, J. E.; KEITER, E. A.; KEITER, R. L. **Inorganic chemistry: Principles of structure and reactivity**. 4^a. ed. New York: Harper Collins, 1993.

HYUN, S. K. *et al.* Inhibitory effects of kurarinol, kuraridinol, and trifolirhizin from *Sophora flavescens* on tyrosinase and melanin synthesis. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 1, p.154-8, 2008.

ICH. Internacional Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use,. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Disponível. Acesso.

ICHIMOTO, I.; TATSUMI, C. Studies on Kojic Acid and its Related -Pyrone Compounds Part VI. Catalytic Hydrogenation of Kojic Acid. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 28, n. 10, p.723-727, 1964.

INMETRO. Orientações sobre validação de métodos de ensaio químicos. DOQ-CGCRE-008, revisão:00-outubro 2002.VIM – Vocabulário Internacional de termos Fundamentais e Gerais de Metrologia, 1995

IUPAC. Selectivity in Analytical Chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n., p.1381-1386, 2001.

JABLONSKI, N. G.; CHAPLIN, G. The evolution of human skin coloration. **Journal of Human Evolution**, v. 39, n. 1, p.57-106, 2000.

JAIN, R.; KAUSHIK, N. K. Some new organotin (IV) complexes with kojic acid and maltol. **Journal of Thermal Analysis**, v. 49, n., p.713-725, 1997.

JONES, K. *et al.* Modulation of melanogenesis by aloesin: a competitive inhibitor of tyrosinase. **PIGMENT CELL RESEARCH**, v. 15, n. 5, p.335-40, 2002.

JORDAN, P. A. *et al.* Defining speciation profiles of Al^{3+} complexed with small organic ligands: the Al^{3+} -heidi system **Coordination Chemistry Reviews**, v. 149, n., p.281-309, 1996.

JUNG, K. *et al.* UV-generated free radicals (FR) in skin: Their prevention by sunscreens and their induction by self-tanning agents. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 69, n., p.1423–1428, 2008.

KANG, S. S. *et al.* Synthesis of tyrosinase inhibitory (4-oxo-4H-pyran-2-yl)acrylic acid ester derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n., p.188-191, 2009.

KARITA, S. *et al.* Determination of kojic acid in rice koji by Bio Gel P-2 column chromatography. **Journal of the Brewing Society of Japan**, v. 86, n., p.884-885, 1991.

KATSAMBAS, A. D.; STRATIGOS, A. J. Depigmenting and bleaching agents: coping with hyperpigmentation. **Clinical Dermatology**, v. 19, n. 4, p.483-8, 2001.

KAWATE, S.; KOIKE, M.; FUKUO, T. Spectrophotometric determination of kojic acid. **Technology Reports Kansai University**, v. 13, n., p.67-79, 1972.

KIM, D. G. *et al.* Lincomycin abrogates dexamethasone-enhanced melanogenesis in B16 melanoma cells. **PIGMENT CELL RESEARCH**, v. 11, n. 3, p.143-150, 2006.

KUAN, W. H. *et al.* Effect of citric acid on aluminum hydrolytic speciation. **Water Research**, v. 39, n. 15, p.3457–3466, 2005.

LAMBERT, J. B.; MAZZOLA, E. P. **Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: An Introduction to Principles, Applications, and Experimental Methods**. 1^a. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2003.

LARSSON, B. S. Interaction between chemicals and melanin. **PIGMENT CELL RESEARCH**, v. 6, n. 3, p.127-133, 2006.

LEE, J. D. **Química Inorgânica. Um texto conciso**. ed. São Paulo: Edgar Blucher, 1980.

_____. **Química inorgânica não tão concisa**. 5^a. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1996.

LEVER, A.B.P.; *Inorganic Electronic Spectroscopy*, Elsevier, Amsterdam, First Edition (1964).

LIM, J. T. E. Treatment of melasma using kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid. **Dermatologic surgery**, v. 25, n. 4, p.282-284, 2001.

LIN, C. H.; WU, H. L.; HUANG, Y. L. Combining high-performance liquid chromatography with on-line microdialysis sampling for the simultaneous determination of ascorbyl glucoside, kojic acid, and niacinamide in bleaching cosmetics. **Analytica Chimica Acta**, v. 581, n. 1, p.102-107, 2007.

LIN, Y. H.; YANG, Y. H.; WU, S. M. Experimental design and capillary electrophoresis for simultaneous analysis of arbutin, kojic acid and hydroquinone in cosmetics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 1, p.279-82, 2007.

LUNA, A. S.; PINHO, J. S. A. A seletividade de um método analítico. **Analytica**, v. 41, n., p.85-88, 2009.

MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C. C. The skin as a mirror of the aging process in the human organism--state of the art and results of the aging research in the German National Genome Research Network 2 (NGFN-2). **Experimental Gerontology**, v. 42, n. 9, p.879-86, 2007.

MARTELL, A.E.; MOTEKAITIS, R.J. The Determination and Use of Stability Constants. VCH, New York (NY), 1992.

MASOUD, M. S. Palladium(II)-kojic acid interaction. **Transition Metal Chemistry**, v.14. p.155-156, 1989

MATOBA, Y. *et al.* Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 13, p.8981-8990, 2006.

MAYO, D. W.; MILLER, F. A.; HANNAH, R. W. **Course notes on the interpretation of infrared and raman spectra**. ed. New Jersey: John Wiley and sons, 2003.

MCBRYDE, W. A. E.; ATKINSON, G. F. Spectrophotometric study of the reaction between iron (III) and kojic acid. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 39, n. 3, p.510-525, 1961.

MCMURRY, J. **Organic Chemistry**. 7. ed. Belmont: Physical sciences, 2008.

MERCÊ, A. L. R. *et al.* Aqueous and solid complexes of iron(III) with hyaluronic acid potentiometric titrations and infrared spectroscopy studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 89, p.212-218, 2002.

MERCÊ, A. L. R. *et al.* Equilibrium studies of galactomannan of *Cassia fastuosa* and *Leucaena leucocephala* and Cu²⁺ using potentiometry and EPR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v.35, p.13-20, 1998

MESSLER, G. L.; TARR, D. A. **Inorganic chemistry**. 3^a. ed. London: Pearson Prentice Hall, 2003.

MILLER, A.; SOLOMON, P. H. **Writing Reaction Mechanisms in Organic Chemistry**. 2^a. ed. New Jersey: Elsevier Science & Technology Books, 1999.

MITANI, H. *et al.* Prevention of the photodamage in the hairless mouse dorsal skin by kojic acid as an iron chelator **European Journal of Pharmacology**, v. 411, n. 1, p.169-174, 2001.

MOHAMAD, R.; ARIFF, A. B. Biotransformation of various carbon sources to kojic acid by cell-bound enzyme system of *A. flavus* Link 44-1. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 2, p.203-209, 2007.

MOMTAZ, S.; LALL, N.; BASSON, A. Inhibitory activities of mushroom tyrosine and DOPA oxidation by plant extracts. **South African Journal of Botany**, v. 74, n. 4, p.577-582, 2008.

MORETTO, P. *et al.* Microanalysis of the human skin structure: preliminary results. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 158, n. 1-4, p.386-392, 1999.

MORTON, H. E. *et al.* Toxicity and antibiotic activity of kojic acid produced by *Aspergillus luteo-virescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 50, n. 5, p.579-584, 1945.

MURAKAMI, Y. Complexing behavior of kojic acid with metal ions. I. Mg (II) and Mn (II) chelates. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 35, n. 1, p.52-56, 1962a.

_____. Complexing behavior of kojic acid with metals ions .II. Fe(III) chelates. **Journal of inorganic and nuclear chemistry**, v. 24, n., p.679-688, 1962b.

MURAKAMI, Y.; MERA, K. Complexing behavior of kojic acid with metal ions. III. Infrared studies of bivalent metal-kojate chelates. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 39, n. 2, p.396-397, 1965.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**. ed. New York: John Wiley and sons, 1986.

NAITO, T. K. *et al.* Modulating effects of a novel skin-lightening agent, alpha-lipoic acid derivative, on melanin production by the formation of DOPA conjugate products. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 5, p.1967-75, 2007.

MARTELL, A. E.; SMITH, R. M. NIST (Standard Reference database 46 version 6.0 - Critically selected stability constants of complexes), Gaithersburg - USA, 2001.

NOH, J. M. *et al.* Kojic acid–amino acid conjugates as tyrosinase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 19, p.5586-5589, 2009.

NOHYNEK, G. *et al.* An assessment of the genotoxicity and human health risk of topical use of kojic acid [5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one]. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 1, p.93-105, 2004.

OLIVEIRA, R. V. M. *et al.* Quantificação de Ácido Kójico em estudos de permeação *in vitro*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 4, p.576-81, 2007.

OOI, K. *et al.* Hypercoordination of boron and aluminum: Synthetic utility as chelating Lewis acids. **Journal of the american chemical society**, v. 120, n. 21, p.5327-5328, 1998.

OWENS, R. G.; WELTY, R. E.; LUCAS, G. B. Gas chromatographic analysis of the mycotoxins kojic acid, terreic acid, and terrein **Analytical Biochemistry**, v. 35, n. 1, p.249-258, 1970.

PANDYA, A. G.; GUEVARA, I. L. Disorders of hyperpigmentation. **Dermatol Clin**, v. 18, n. 1, p.91-8, ix, 2000.

PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p.198-219, 2003.

PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, p.3533-3539, 1963.

PENNA, G.; RAMOS, A.; CAFÉ, M. E. Perfil nosológico das consultas dermatológicas no Brasil. **An Bras Dermatol.**, v. 81, n. 6, p.549-58, 2006.

PERSSON, B.-A.; VESSMAN, J. Generating selectivity in analytical chemistry to reach the ultimate – specificity. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 17, n. 3, p.117-119, 1998.

_____. The use of selectivity in analytical chemistry – some considerations. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 10, p.526-532, 2001.

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOFF, F. Validation of new methods. **Forensic Science International**, v. 165, n. 2-3, p.216-224, 2006.

PHARMACOPEIA, U. S. **US Pharmacopeia 24, Validation of Compendial Methods**. ed. Rockville, 1999.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p.268-277, 1996.

PLONKA, P. M.; GRABACKA, M. Melanin synthesis in microorganisms--biotechnological and medical aspects. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, n. 3, p.429-43, 2006.

POWELL, J. Skin physiology **The Foundation Years** v. 3, n. 5, p.193-196, 2007.

PROTA, G. Melanins, melanogenesis and melanocytes: Looking at their functional significance from the chemist's viewpoint. **PIGMENT CELL RESEARCH**, v. 13, n. 4, p.283-293, 2001.

QIU, L. *et al.* Inhibitory effects of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid on the activity of mushroom tyrosinase. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p.609-613, 2009.

QURESHI, A. A.; PRENTICE, N.; BURGER, W. C. Separation of potential flavoring compounds by high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography A**, v. 170, n. 2, p.343-353, 1979.

RESZKO, A. E.; BERSON, D.; LUPO, M. P. Cosmeceuticals: Practical Applications. **Dermatologic Clinics**, v. 27, n. 4, p.401-416, 2009.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

ROZET, E. *et al.* Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of chromatography A**, v. 1158, n. 1-2, p.111-125, 2007.

RUIZ-MALDONADO, R.; OROZCO-COVARRUBIAS, M. L. Postinflammatory hypopigmentation and hyperpigmentation. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 16, n. 1, p.36-43, 1997.

SAKUMA, K. *et al.* Relationship between tyrosinase inhibitory action and oxidation-reduction potential of cosmetic whitening ingredients and phenol derivatives. **Archives of pharmacal research**, v. 22, n. 4, p.335-339, 1999.

SALLAM, S. A.; HAGGAG, S. S.; MASOUD, M. S. Thermodynamic parameters of ionization of kojic acid and its coordinating behaviour towards transition metals. **Thermochimica Acta**, v. 168, n., p.1-7, 1990.

SATO, M. E. O. *et al.* Permeação cutânea in vitro do ácido kójico. **Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas**, v. 43, n. 2, 2007.

SCHMIDT, R.; KRIEN, P.; RÉGNIER, M. The use of diethylaminoethyl-cellulose membrane filters in a bioassay to quantify melanin synthesis **Analytical Biochemistry**, v. 235, n. 2, p.113-118, 1996.

SCOTT, P. M.; LAWRENCE, W.; WALBEEK, W. Detection of mycotoxins by thin-layer chromatography: application to screening of fungal extracts. **Applied microbiology**, v. 20, n. 5, p.839-842, 1970.

SELVAAG, E. Skin depigmentation due to antimalarial prophylaxis with chloroquine. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 90, n. 6, p.683, 1996.

SENYUVA, H. Z.; GILBERT, J.; OZTURKOGLU, S. Rapid analysis of fungal cultures and dried figs for secondary metabolites by LC/TOF-MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 617, n. 1-2, p.97-106, 2008.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of chromatography A**, v. 987, n. 1-2, p.57-66, 2003.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 3^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara S.A, 1979.

_____. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7^a. ed. New York: John Wiley e sons, inc, 2005.

SKOOG, D. A. *et al.* **Analytical chemistry : an introduction**. 7. ed. Philadelphia, 2000.

SLOMINSKI, A. *et al.* Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 4, p.1155-228, 2004.

SOLOMONS, T. W. G. **Química orgânica**. 6a. ed. Rio de Janeiro: LTC Editora SA, 1996.

STENSON, A. C.; CIOFFI, E. A. Speciation of M+3-hydroxypyrone chelation complexes by electrospray ionization ion trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 16, p.2594-2600, 2007.

STREFFER, K. *et al.* Application of a sensitive catechol detector for determination of tyrosinase inhibitors. **Analytica Chimica Acta**, v. 362, n. 1, p.81-90, 1998.

STUART, B. **Infrared spectroscopy: fundamentals and applications**. ed: John Wiley and sons, 2004.

STULBERG, D. L.; CLARK, N.; TOVEY, D. Common hyperpigmentation disorders in adults: Part I. Diagnostic approach, cafe au lait macules, diffuse hyperpigmentation, sun exposure, and phototoxic reactions. **American family physician**, v. 68, n. 10, p.1955-60, 2003.

STURM, R. A.; TEASDALE, R. D.; BOX, N. F. Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation. **Gene**, v. 277, n. 1-2, p.49-62, 2001.

SYNYTSYA, A. *et al.* Conjugation of kojic acid with chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 1, p.21-31, 2007.

TAKAMIZAWA, K. *et al.* Optimization of kojic acid production rate using the box-Wilson method. **JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING**, v. 82, n. 4, p.414-416, 1996.

TAMURA, T. *et al.* Absence of in vivo genotoxic potential and tumor initiation activity of kojic acid in the rat thyroid. **Toxicology**, v. 222, n. 3, p.213-224, 2006.

TANIGAKI, H.; OBATA, H.; TOKUYAMA, T. The determination of kojic acid using the stopped-flow method. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 53, n. 11, p.3195-3197, 1980.

TAYLOR, S. C. Skin of color: Biology, structure, function, and implications for dermatologic disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 46, n. 2, p.S41-S62, 2002.

TEPPER, A. W. J. W.; BUBACCO, L.; CANTERS, G. W. Structural Basis and Mechanism of the Inhibition of the Type-3 Copper Protein Tyrosinase from *Streptomyces antibioticus* by Halide Ions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 34, p.30436-30444, 2002.

TSATMALI, M.; ANCANS, J.; THODY, A. J. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 50, n. 2, p.125-33, 2002.

UM, S. J. *et al.* Synthesis of new glycyrrhetic acid (GA) derivatives and their effects on tyrosinase activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 24, p.5345-5352, 2003.

VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do Mudi**, v. 11, n. 2, p.26-31, 2007.

VAN ARENDONK, M. D.; SKOGERBOE, R. K.; GRANT, C. L. Correlation coefficients for evaluation of analytical calibration curves. **Analytical chemistry**, v. 53, n. 14, p.2349-2350, 1981.

VENTURINI-SORIANO, M.; BERTHON, G. Aluminum speciation studies in biological fluids. Part 4. A new investigation of aluminum±succinate complex formation under physiological conditions, and possible implications for aluminum metabolism and toxicity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 71, n. 1, p.135-145, 1998.

VESSMAN, J. Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, n. 8-10, p.867-869, 1996.

WALFISH, S. Analytical Methods: A Statistical Perspective on the ICH Q2A and Q2B Guidelines for Validation of Analytical Methods. **BioPharm International**, v., n., p.1-6, 2006.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical analysis A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. 1. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999.

WILKINSON, J. B.; MOORE, R. J. **Cosmetologia de Harry**. ed. Madrid: Ediciones Diaz de Santos, S.A, 1990.

WOOD, R. How to validate analytical methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 9-10, p.624-632 1999.

YAMAGUCHI, Y.; BRENNER, M.; HEARING, V. J. The regulation of skin pigmentation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 38, p.27557-61, 2007.

YANG, X.; ZHANG, H. Sensitive determination of kojic acid in foodstuffs using PVP (polyvinylpyrrolidone) modified acetylene black paste electrode. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p.1223-1227, 2007.

ZBOROWSKI, K.; GRYBOS, R.; PRONIEWICZ, L. M. Determination of the most stable structures of selected hydroxypyrones and their cations and anions. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 639, n. 1-3, p.87-100, 2003.

ZERINGUEJR, H. J. *et al.* Identification of the bright-greenish-yellow-fluorescence (BGY-F) compound on cotton lint associated with aflatoxin contamination in cottonseed. **Phytochemistry**, v. 52, n. 8, p.1391-1397, 1999.